



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Determinación del patrón de diferenciación
longitudinal de los cromosomas prometafásicos de la
llama *Lama glama* (Linnaeus, 1758) mediante la
técnica GTG**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Vania Belén IBERICO MANSILLA

ASESOR

Margarita Rosa Eugenia VELÁSQUEZ REINOSO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Iberico, V. (2020). *Determinación del patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas prometafásicos de la llama *Lama glama* (Linnaeus, 1758) mediante la técnica GTG*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

| | |
|--|---|
| Código ORCID del autor | https://orcid.org/0000-0003-2643-9428 |
| DNI o pasaporte del autor | DNI: 72917502 |
| Código ORCID del asesor | https://orcid.org/0000-0003-2589-0508 |
| DNI o pasaporte del asesor | DNI: 25594148 |
| Grupo de investigación | GENES, CROMOSOMAS Y GENOMAS DE MAMIFEROS (GECROGEM) |
| Financiamiento | <p>Un Financiadore:</p> <p>1) Nombre y siglas de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nombre: Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM ✓ Siglas: UNMSM-VRIP <p>País de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Perú <p>Nombre del programa financiero</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Concurso del Programa e Promoción de Tesis de Pregrado <p>Código</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ B17101411 |
| Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación | <p>Lugar: Universidad Nacional Mayor de San Marcos</p> <p>País: Perú, Departamento: Lima, Provincia: Lima, Distrito: Lima</p> <p>Coordenadas geográficas: 12°3'30" S, 77°5'0" W (-12.058333, -77.083333)</p> |
| Año o rango de años que la investigación abarcó | 2017-2019 |
| Disciplinas OCDE | <p>Genética, Herencia</p> <p>http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07</p> |



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 09:10 horas del 13 de octubre de 2020, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas con dirección en la G-Suite de Google meet.google.com/euj-bvts-ovm

y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **VANIA IBERICO MANSILLA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **002-EPGB-2020**, la titulando expuso su tesis: **“DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE DIFERENCIACIÓN LONGITUDINAL DE LOS CROMOSOMAS PROMETAFAÁSICOS DE LA LLAMA *Lama glama* (LINNEAUS, 1758) MEDIANTE LA TÉCNICA GTG”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20 calificativo: **APROBADA CON MAXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **VANIA IBERICO MANSILLA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 13 de octubre de 2020.

Mg. OLGA BRACAMONTE GUEVARA
REINOSO (PRESIDENTA)

Blga. MARGARITA VELASQUEZ
(ASESORA)



Firmado digitalmente por VALDIVIA
CUYA Martha Esther FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 13.10.2020 17:56:45 -05:00

Dra. MARTHA VALDIVIA CUYA
(MIEMBRO)

Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, especialmente mis padres Elsa Mansilla y Carlos Iberico, por ser mi ejemplo de superación y animarme a terminar mis estudios universitarios y lograr mis metas.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Mayor de San Marcos que financió el proyecto “Aplicación de las técnicas de diferenciación longitudinal del cromosoma para verificar la existencia de dos cariotipos diferentes en llamas y alpacas” código B17101411, que me permitió financiar parte de esta tesis.

A mis queridos profesores y mentores Dr. Jaime Descailleaux y Blga. Margarita Velásquez, por sus consejos, enseñanzas, apoyo, la amistad brindada y sobre todo por haberme dado la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Genética Humana.

Al Blgo. Jesús Córdova, quien con su experiencia, conocimientos, motivación y ayuda me permitió terminar este estudio.

A mis amigos, compañeros del laboratorio y colegas: Liza Linares, Celes Inga, Andrea Sanchez y Josmar Choquepuima, por todo el apoyo y motivación brindada.

A Fernando Calero por enseñarme el uso de los programas de diseño empleados en la elaboración de los cariogramas e idiogramas y por su paciencia y ánimos durante este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| RESUMEN | vi |
| ABSTRACT | vii |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS | 4 |
| 2.2. HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS | 6 |
| 2.3. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS | 7 |
| 2.4. IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA | 9 |
| 2.5. CITOGENÉTICA DE LOS CAMÉLIDOS | 11 |
| 2.5.1. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA | 11 |
| 2.5.2. BANDEOS CROMOSÓMICOS | 13 |
| 2.5.3. CITOGENÉTICA MOLECULAR | 18 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 20 |
| 3.1. HIPÓTESIS | 20 |
| 3.2. OBJETIVOS | 20 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 21 |
| 4.1. MATERIALES | 21 |
| 4.1.1. POBLACIÓN ESTUDIADA | 21 |
| 4.1.2. EQUIPOS | 21 |
| 4.1.3. INSUMOS | 22 |
| 4.1.4. REACTIVOS | 22 |
| 4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 23 |
| 4.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS | 23 |
| 4.2.2. CULTIVO DE LINFOCITOS | 24 |
| 4.2.2.1. SIEMBRA | 24 |
| 4.2.2.2. PREPARACIÓN CITOLÓGICA | 25 |
| 4.2.2.3. PREPARACIÓN DE LÁMINAS | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2.4. TÉCNICA DE BANDEO CROMOSÓMICO GTG ----- | 26 |
| 4.2.2.5. COLORACIÓN CON GIEMSA ----- | 27 |
| 4.2.3. TOMA DE FOTOGRAFÍAS ----- | 27 |
| 4.2.4. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS ----- | 27 |
| 4.2.5. CONFECCIÓN DE IDIOGRAMA ----- | 29 |
| 5. RESULTADOS ----- | 30 |
| 5.1. COLORACIÓN CON GIEMSA ----- | 30 |
| 5.1.1. PARÁMETROS MÉTRICOS IC Y RCL ----- | 30 |
| 5.1.2. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA ----- | 31 |
| 5.1.3. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS ----- | 32 |
| 5.2. TÉCNICA GTG ----- | 34 |
| 5.2.1. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS ----- | 34 |
| 5.2.2. DISEÑO DE IDIOGRAMAS ----- | 36 |
| 5.2.3. NIVEL DE RESOLUCIÓN DE BANDAS G ----- | 40 |
| 5.2.4. VARIABLES DEL BRAZO CORTO DE LOS CROMOSOMAS 1 Y 5 ----- | 43 |
| 6. DISCUSIÓN ----- | 47 |
| 6.1. CARIOGRAMA POR COLORACIÓN CON GIEMSA ----- | 47 |
| 6.2. CARIOGRAMA OBTENIDO POR LA TÉCNICA GTG ----- | 48 |
| 6.3. NIVEL DE RESOLUCIÓN DE BANDAS G ----- | 50 |
| 6.4. VARIABLES DEL BRAZO CORTO DE LOS CROMOSOMAS 1 Y 5 ----- | 51 |
| 7. CONCLUSIONES ----- | 54 |
| 8. RECOMENDACIONES ----- | 55 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 56 |
| 10. ANEXOS ----- | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Clasificación taxonómica de la familia Camelidae. | 4 |
| Figura 2: Variedades fenotípicas de la llama. | 5 |
| Figura 3: Evolución de los camélidos. | 8 |
| Figura 4: Bandas G en el par cromosómico 1 de camélidos sudamericanos. | 15 |
| Figura 5: Pares cromosómicos 34 y 35 de alpaca y llama. | 16 |
| Figura 6: Pares cromosómicos 1 a y b de alpacas y llamas. | 17 |
| Figura 7: Distribución heteromórfica y homomórfica del cromosoma 1p en alpacas (ab) y llamas (bb). | 17 |
| Figura 8: Metafase coloreada con Giemsa de la llama ♂ 10-A y su cariograma. | 33 |
| Figura 9: Metafase con bandas G de la llama ♂ 1-A y su cariograma. | 35 |
| Figura 10: Cariograma haploide de la llama ♀ 3-A y el idiograma 1 de bandas G al nivel de resolución de 420 bandas. | 37 |
| Figura 11: Cariograma haploide de la llama ♂ 1-A y el idiograma 1 de bandas G al nivel de resolución de 420 bandas. | 38 |
| Figura 12: Cariograma haploide de la llama ♂ 11-A y el idiograma 2 de bandas G al nivel de resolución de 231 bandas. | 39 |
| Figura 13: Comparación de los cromosomas e idiogramas de bandas G a los niveles de resolución de 231 bandas (A) y 420 bandas (B). | 42 |
| Figura 14: Secuencias frecuentes de bandas G del cromosoma 1 de llama observadas a dos niveles de resolución (231 y 420) y sus idiogramas. | 44 |
| Figura 15: Heteromorfismo en el brazo corto del cromosoma 1 de llama. | 45 |
| Figura 16: Secuencia frecuente de bandas G del cromosoma 5 de llama y su idiograma. | 45 |
| Figura 17: Heteromorfismo en el brazo corto del cromosoma 5 de llama. | 46 |
| Figura 18: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final. | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 19: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.. | 65 |
| Figura 20: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.. | 66 |
| Figura 21: Metafase de la llama ♂ 10-A coloreada con Giemsa y su cariograma final. | 67 |
| Figura 22: Metafase de la llama ♂ 10-A coloreada con Giemsa y su cariograma final. | 68 |
| Figura 23: Metafase de la llama ♂ 11-A coloreada con Giemsa y su cariograma final. | 69 |
| Figura 24: Metafase de la llama ♂ 1-A y su cariograma de bandas G.. | 70 |
| Figura 25: Metafase de la llama ♂ 1-A y su cariograma de bandas G. | 71 |
| Figura 26: Metafase de la llama ♀ 1-H y su cariograma de bandas G..... | 72 |
| Figura 27: Metafase de la llama ♀ 3-A y su cariograma de bandas G. | 73 |
| Figura 28: Metafase de la llama ♀ 3-A y su cariograma de bandas G. | 74 |
| Figura 29: Metafase de la llama ♂ 2-A y su cariograma de bandas G.. | 75 |
| Figura 30: Cromosomas autosómicos y sexuales de llama de diferentes metafases con los idiogramas | 76 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Estimativa promedio de la longitud relativa del cromosoma (RCL) y el índice centromerico (IC). | 30 |
| Tabla 2: Clasificación y cantidad total por morfología de los 36 pares autosómicos y el par sexual de la llama. | 31 |
| Tabla 3: Cantidad de bandas G por brazo cromosómico y por cromosoma de llama.. | 41 |
| Tabla 4: Tabla de medidas cromosómicas de una metafase coloreada con Giemsa de la llama ♂ 11-A..... | 62 |

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo caracterizar los cromosomas prometafásicos de la especie *Lama glama* (Linnaeus, 1758) mediante la aplicación de la técnica de diferenciación longitudinal GTG. Se realizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica por incorporación de 5-BrdU de 21 llamas aparentemente sanas y fértiles procedentes de las regiones de Huancavelica y Junín. El análisis de los cariogramas coloreados con Giemsa permitió constatar su número diploide en $2n=74$ y su patrón de diferenciación sexual del tipo XX/XY; asimismo, basado en el Índice Centromérico (IC) se definió la morfología de cada par cromosómico en: 14 acrocéntricos; 12 submetacéntricos y 10 metacéntricos, más los cromosomas sexuales X e Y (ambos metacéntrico). Se ordenó los cromosomas por sus valores de Longitud Relativa del Cromosoma (RCL) en orden decreciente, y se propone el cariograma modelo de la especie. Posteriormente, se identificó y caracterizó cada par cromosómico con la técnica GTG, permitiendo el diseño de dos idiogramas de bandas G a los niveles de resolución de 231 bandas y 420 bandas, con lo cual se sustenta la obtención de cromosomas prometafásicos. Adicionalmente, se observó variantes en la secuencia de bandas G de los brazos cortos de los cromosomas 1 y 5 originados posiblemente por eventos de duplicaciones y deleciones, siendo el primer reporte de heteromorfismos intraespecíficos de esta especie. En conclusión, el cultivo celular por incorporación de 5-BrdU permite obtener cromosomas prometafásicos de llama con morfología definida y ser identificados longitudinalmente por la técnica GTG, permitiendo la propuesta del cariograma e idiograma por bandas G modelo de la especie y la detección de individuos con pares cromosómicos heteromórficos.

Palabras claves: Llama, cariograma, morfología, técnica GTG, idiograma.

ABSTRACT

This study aims to characterize the prometaphase chromosomes of the *Lama glama* species (Linnaeus, 1758) by applying the GTG longitudinal differentiation technique. Peripheral blood lymphocyte cultures were performed by incorporating 5-BrdU of 21 apparently healthy and fertile llamas from the Huancavelica and Junín regions. The analysis of the kariograms colored with Giemsa allowed to verify their diploid number at $2n = 74$ and their pattern of sexual differentiation of the type XX / XY; also, based on the Centromeric Index (CI), the morphology of each chromosomal pair was defined as: 14 acrocentric; 12 submetacentric and 10 metacentric, plus the X and Y sex chromosomes (both metacentric). The chromosomes were ordered by their Relative Chromosome Length values (RCL) in decreasing order, and the model kariogram of the species is proposed. Subsequently, each chromosomal pair was identified and characterized with the GTG technique, allowing the design of two G-bands ideograms at the resolution levels of 231 bands and 420 bands, which supports the obtaining of prometaphase chromosomes. Additionally, variants were observed in the G-bands sequence of the short arms of chromosomes 1 and 5, possibly caused by duplication and deletion events, being the first report of intraspecific heteromorphisms of this species. In conclusion, the cell culture by incorporation of 5-BrdU allows to obtain flame prometaphase chromosomes with defined morphology and be identified longitudinally by the GTG technique, allowing the proposal of the kariogram and ideogram by G-bands model of the species and the detection of individuals with chromosomal pairs heteromorphic.

Keywords: llama, kariogram, morphology, GTG technique, ideogram.

1. INTRODUCCIÓN

Los camélidos del Nuevo Mundo o Camélidos Sudamericanos (CSA) pertenecen a la familia Camelidae, junto con el camello y dromedario, e incluye 4 especies: la llama (*Lama glama*), la alpaca (*Lama pacos*), la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) y (Wheeler, 1995).

Los antecesores de los CSA llegaron a tierras sudamericanas hace 2 millones de años, siendo recién en la época incaica donde comenzó su proceso de domesticación. Sin embargo, la conquista del Tahuantinsuyo por los españoles ocasionó el descuido de estos animales, de tal manera que de ser especies de importancia ganadera, con el tiempo fueron desplazadas por especies importadas como caprinos, equinos, ovinos y bovinos, y que sumado a la presión de su cacería y su explotación como animales de carga, conllevó a que huyeran hacia las alturas, lugar donde habitan actualmente (Cardich, 1985; Matos y Rabines, 1985; Rostworowski, 1988).

Este hecho, tuvo tanto efectos positivos como negativos para estas especies. El efecto positivo fue la adaptación a la altura que desarrollaron y así poder subsistir donde otras especies no lo logran debido a las condiciones climáticas extremas. Adicionalmente con la alimentación de plantas típicas de esta región, que tornan su carne rica en fibra, las convierten en principales especies ganaderas económicamente rentable del Altiplano (Pinto *et al.*, 2010). El efecto negativo fue la pérdida de conocimientos milenarios de los usos y los métodos aplicados a su manejo (Cardich, 1985; Matos y Rabines, 1985; Rostworowski, 1988).

En la década de los 60 comenzaron los estudios citogenéticos en los camélidos siendo el primer aporte la confirmación de su número diploide $2n=74$ (Hsu y Bernirschkle, 1967; Taylor *et al.*, 1968; Koulischer *et al.*, 1971). El reporte de la gran similitud de sus cariogramas y sus patrones de bandas G, R y C, así como la cantidad y localización de los NORs (Región organizadora nucleolar) entre las 6 especies de la familia Camelidae, reforzaron la idea de un único cariotipo extremadamente conservado (Bunch *et al.*, 1985, Bianchi *et al.*, 1985).

De otro lado, existe el problema de contradicciones en relación a la morfología de los 36 pares autosómicos y del cromosoma sexual Y. Esta situación ocurre debido al grado de dificultad que se presenta en su análisis citogenético ocasionado por la cantidad elevada de cromosomas (74) y la presencia de numerosos cromosomas de pequeña longitud lo cual origina inconvenientes para determinar su morfología (Ramos, 2014).

Debido a estas características de los cromosomas de camélidos, se llegó a pensar que la citogenética en camélidos no podría dar mayores aportes, sin embargo, dos investigaciones han permitido revertir este pensamiento. El primero fue el reporte de un distinto patrón de bandeo G del brazo corto del cromosoma 1 entre los CSA silvestres y domésticos que respalda potentemente la hipótesis de origen de la llama a partir de *L. guanicoe*, y la alpaca de *V. vicugna* (Marin *et al.*, 2007). El segundo, es el informe de diferencias en la morfología de los cromosomas 34 y 35 entre llamas y alpacas (Ramos, 2014; Descailleaux, 2018). Las investigaciones de estos dos últimos autores permiten conjeturar que posiblemente haya más discrepancias entre los cromosomas de los camélidos, y que a través de la optimización de las técnicas de cultivo celular y de marcación cromosómica, así como de la aplicación de la técnica de marcación cromosómica Hibridación fluorescente *in situ* (FISH), será factible visibilizar las diferencias cromosómicas.

A través de este estudio se pretende brindar conocimientos citogenéticos de la especie *Lama glama*, mediante el empleo de dos metodologías: Primero, trabajar con la coloración con Giemsa, que facilita la medición de los cromosomas, así aportar al conocimiento de la morfología de algunos pares cromosómicos del cariotipo de la llama, con la intención de proveer una futura estandarización de la nomenclatura cromosómica internacional de la especie. Segundo, utilizar la técnica de diferenciación longitudinal GTG (obtención de bandas G por digestión enzimática con tripsina y coloración con Giemsa) en cromosomas prometafásicos de llama, a fin de caracterizar cada par cromosómico para que en estudios posteriores se puedan elaborar mapas citogenéticos, que contribuyan a la comprensión de la evolución comparativa de los cromosomas y a encontrar más diferencias entre los cariogramas de los camélidos. Asimismo, posibilitará la determinación de otros marcadores citogenéticos empleados para la detección de cromosomas individuales, regiones cromosómicas y bandas lo que permitirá un mejor diagnóstico de las alteraciones cromosómicas en el área de la citogenética clínica, es así que se mejorará el criterio de selección de animales sanos, con características deseadas para los programas de reproducción.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La familia Camelidae pertenece al Orden Artiodactyla, Suborden Tylopoda (Fowler, 2008), se encuentra conformada por dos tribus: Lamini y Camelini (Stanley *et al.*, 1994 y Wheeler *et al.*, 1995). La tribu Camelini se distribuye en las zonas desérticas de Asia y África, y contiene únicamente al género *Camelus* que incluye dos especies: el dromedario (*Camelus dromedarius*, Linnaeus 1758), y el camello (*Camelus bactrianus*, Linnaeus 1758). La tribu Lamini se encuentra conformada por dos géneros: *Lama* y *Vicugna*, y 4 especies, dos de las cuales son domésticas: la alpaca (*Lama pacos*, Linnaeus 1758) y la llama (*Lama glama*, Linnaeus 1758), y dos silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*, Müller 1776) y la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina 1782) (Wheeler, 1995) (Figura 1).

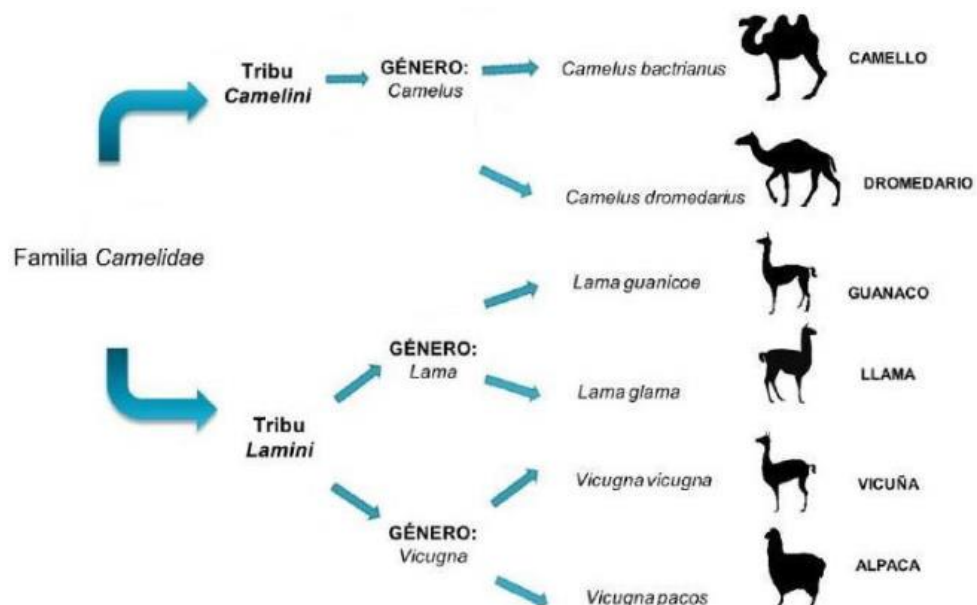


Figura 1: Clasificación taxonómica de la familia Camelidae.

Fuente: Pinto *et al.* (2012).

Las especies de la tribu Lamini habitan los altiplanos de los países sudamericanos Bolivia, Argentina, Colombia, Chile, Paraguay, Ecuador, y Perú (Fernández, 2005) y son conocidas como Camélidos del Nuevo Mundo o Camélidos Sudamericanos (CSA).

Se ha reconocido dos variedades fenotípicas de la llama: la Q'ara y la chaku (Figura 2). La gran mayoría son de la variedad Q'ara o pelada caracterizada por la poca cantidad de fibra en su cuerpo y la ausencia de fibra en su cara y extremidades además de tener fibra de baja calidad, razón por la cual es empleada en la producción de carne. La variedad menos común es la chaku o lanuda y se le denomina así por la gran cantidad de vellón de regular calidad que recubre todo su cuerpo lo que permite su empleo en la producción de fibra (Wheeler, 1991; Stemmer *et al.*, 2005).



Figura 2: Variedades fenotípicas de la llama. Fuente: CONACS (2005)

2.2. HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

Existen 5 híbridos fértiles originados por entrecruzamientos entre las 4 especies de CSA: Huarizo (llama ♂ x alpaca ♀), Misti (llama ♀ x alpaca ♂), Paco-Vicuña (alpaca ♀ x vicuña ♂), Llamo-Vicuña (llama ♂ x vicuña ♀) y Llamo-Guanaco (llama ♀ x guanaco ♂) (Calle, 1982).

El cruce entre las especies de la tribu Camelini también ha sido reportado por Mason (1984), inclusive el empleo de técnicas biotecnológicas ha permitido obtener un híbrido intergenérico dromedario - guanaco estéril (Skidmore *et al.*, 1999).

Estos cruces se producen con baja frecuencia de manera natural, sin embargo, Kadwell *et al.* (2001), al realizar estudios genéticos moleculares, documentaron una extensa hibridación entre alpacas y llamas, y reportaron que el 40 y 80 % de individuos analizados, respectivamente, son híbridos, resultado corroborado por Wheeler (2005), quien informó que dicho porcentaje puede ser incluso mayor a 90% en alpacas.

Estos elevados porcentajes de hibridación se explican por la mayor valorización monetaria que dio la empresa textil hace 30 años al peso de la fibra de camélidos en vez de considerar la calidad. Es así que los centros de crianza intervinieron en la producción de Huarizos, debido a su capacidad de generar una mayor cantidad de fibra que la alpaca y más fina que la de la llama, lo que ocasionó pérdida de sus genomas originales, disminución de la diversidad genética, degeneración de la calidad y el valor de su fibra y probablemente un pobre desempeño reproductivo (Reyna, 2005).

El cariotipo conservado de la familia Camelidae ($2n=74$) tanto en morfología como en secuencias de bandas explica la ocurrencia de entrecruzamiento entre estas especies que conllevan al nacimiento de crías fértiles. A través de estos resultados se evidencia la falta de aislamiento reproductivo en esta familia y genera la interrogante de que si los camélidos se encuentran todavía en un proceso de especiación respaldado por el poco tiempo de separación evolutiva entre sus tribus Camelini y Lamini (Balmus *et al.* 2007).

2.3. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos se originaron en la parte central de América del Norte en el periodo Eoceno tardío hace poco más o menos de 45 millones de años con la aparición de su primer ancestro *Protylopus petersoni* (Stanley *et al.*, 1994). Durante el Mioceno tardío, casi 11 millones de años atrás, se originó la tribu Lamini con la aparición del género *Pliauchenia* en las praderas del oeste de Norte América (Harrison, 1985), del cual se originó el género *Hemiauchenia* hace 10 millones de años aproximadamente (Webb, 1974), que se diferenció, posteriormente, en dos géneros *Paleolama* y *Lama*, los cuales migraron hacia América del Sur por el Istmo de Panamá hace 3 millones de años. Al mismo tiempo, especies del género *Paracamelus* migraron por el estrecho de Bering hacia Asia, y se originaron los primeros ancestros de la tribu Camelini los cuales evolucionaron a las especies conocidas actualmente (Figura 3).



Figura 3: Evolución de los camélidos. Fuente: Pinto *et al.* (2010).

La extinción de los géneros *Hemiauchenia* y *Paleolama* en América ocurrió hace 2 millones de años, donde subsistió solamente el género *Lama* en Sudamérica (Huanca 1993), y se subdividió posteriormente en los dos géneros que conforman actualmente a los CSA *Lama* y *Vicugna*.

El origen de los CSA domésticos ha sido tema de controversia, debido a la alta tasa de hibridación entre ellos (Kadwell *et al.*, 2001), pese a esto la hipótesis sobre el origen de la llama y la alpaca como resultado de la domesticación del guanaco y la vicuña respectivamente es la más aceptada y está respaldada por investigaciones que incluyen análisis por ADN (Stanley *et al.*, 1994; Kadwell *et al.*, 2001, Marín *et al.*, 2007) y análisis por bandeo GTG (Marín *et al.*, 2007).

2.4. IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA

En Perú, los CSA son un recurso genético de gran importancia para el desarrollo del país, debido a que constituyen un medio de sustento de un sector fundamental de las poblaciones peruanas altoandinas (Ameghino y DeMartini, 1991), siendo sus principales beneficios la obtención de carne, fibras y pieles, usadas en la alimentación y fabricación de cuerdas, alfombras y tapices (Fowler, 1998), de otro lado, el excremento es empleado como abono y combustible para la cocción de alimentos (Pinto *et al.*, 2010).

La capacidad de los CSA de adaptarse a los climas extremos de las grandes altitudes les permite habitar ambientes situados por encima de los 3 000 msnm donde otros animales como ovinos y caprinos no sobreviven, razón por la cual la crianza de estas especies es la principal actividad ganadera realizada en estas regiones (Pinto *et al.*, 2010).

La alimentación de los CSA se basa en los pastizales característicos de la región puna como el ichu, es así que se aprovecha muy bien la vegetación nativa de estos ambientes, además que con ello la producción de la carne es baja en colesterol y presenta fibras de alta calidad (Iñiguez y Alem, 1996), características que hacen más rentable su manejo.

Otra característica de la llama, muy favorable para las comunidades andinas, es su gran tamaño (ONU, 2010) por lo cual ha sido empleada desde la época incaica, como animal de carga, transportando insumos para las labores agrícolas y de otros productos a los lugares de comercialización ubicados en regiones sin vías de comunicación (Iñiguez y Alem, 1996). En la actualidad, también es

utilizada como animal de pastoreo, protege rebaños de ovejas contra ataques de predadores como coyotes y zorros (Franklin y Powell, 1994).

Pese a su importancia en nuestro país, el Perú cuenta con apenas el 25% de la población sudamericana de llamas a diferencia de Bolivia que alberga el 70 % (Leguía, 1995).

El reducido número poblacional de llamas afecta directamente la economía del país ya que al haber menor cantidad de animales hay una limitada disponibilidad de los recursos, baja productividad de los rebaños, pobres niveles de producción y una menor integración de las cadenas productivas con el mercado (UNEPCA, 1997).

Por otro lado, la población de llamas observada en nuestro país no ha sido constante en el tiempo, se sabe que en la época incaica se podían encontrar abundantes rebaños en la costa y la sierra (Gispert, 1984). Se conoce que la principal razón de la disminución de su población fue la llegada de los españoles, que hicieron que se desplazaran a lugares de mayor altitud para evitar ser cazadas y explotadas como animales de carga en las minas durante la época colonial; de la misma forma, las llamas también sufrieron desplazamiento por la llegada de especies extranjeras, como equinos, caprinos, ovinos y bovinos, lo que ocasionó que con el pasar de los años se fueran perdiendo los hábitos y los métodos de crianza, no conociéndose al presente en forma definida los usos y las técnicas empleadas en su manejo (Cardich, 1985; Matos y Rabines, 1985; Rostworowski, 1988).

2.5. CITOGENÉTICA DE LOS CAMÉLIDOS

2.5.1. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

En las primeras investigaciones citogenéticas realizadas en camélidos, se reportó un cariotipo equivoco de $2n=72$ (Capanna y Civitelli, 1965; Hungerford y Snyder, 1966), siendo Hsu y Bernirschkle en 1967 los primeros en reportar el número diploide $2n=74$, resultado confirmado posteriormente por diversos autores (Taylor *et al.*, 1968; Koulischer *et al.*, 1971; Bunch *et al.*, 1985; Bianchi *et al.*, 1985; Di Berardino *et al.*, 2006; Balmus *et al.*, 2007; Marín *et al.*, 2007; Ramos, 2014; Descailleaux, 2018).

A pesar del conocimiento del cariotipo, todavía no se ha logrado obtener el cariograma ni idiograma definitivos de estas especies debido a la existencia de discrepancias entre los diferentes reportes que consideran los tipos de cromosomas autosómicos según su morfología. Estos trabajos se mencionan a continuación, agrupados de la siguiente manera:

A. GRUPO 1: Reportes de la morfología cromosómica de camélidos obtenidos por análisis visual.

- Taylor *et al.* (1968) estudiaron los cromosomas de guanaco, dromedario y camello e informaron un grupo de 5 pares cromosómicos entre meta y submetacéntricos y 31 pares de cromosomas acrocéntricos.
- Koulischer *et al.* (1971) reportaron la presencia de 7 pares cromosómicos entre sub y metacéntricos y 29 pares cromosómicos acrocéntricos en vicuñas y camellos.
- Bunch *et al.* (1985) describieron tres pares de cromosomas submetacéntricos y 33 pares de cromosomas acrocéntricos en los camélidos camello, guanaco y llama.

- Bianchi *et al.* (1985) informaron que en las 4 especies de camélidos sudamericanos estudiadas, los 20 primeros pares cromosómicos son acrocéntricos subterminales y los 16 pares restantes considerados entre sub y metacéntricos.
- Balmus *et al.* (2007) determinaron que el cariotipo del dromedario está compuesto por un par metacéntrico, tres submetacéntricos y 32 acrocéntricos.

B. GRUPO 2: Reportes de la morfología cromosómica de camélidos determinados por medidas.

- Di Berardino *et al.* (2006) clasificaron los cromosomas de la alpaca, considerando los criterios reportados por Levan *et al.* (1964) y el índice centromérico, en 4 grupos: grupo A, subtelocéntricos, del par 1 al 10; grupo B, telocéntricos, del par 11 al 20; grupo C, submetacéntricos, del par 21 al 29 y grupo D, metacéntricos, desde el par 30 al 36.
- Marín *et al.* (2007) reportaron que las 4 especies de CSA presentaban los primeros 20 pares cromosómicos acrocéntricos y los 16 pares restantes entre sub y metacéntricos.
- Ramos (2014) realizó un estudio citogenético comparativo entre llama y alpaca, evaluó la morfología de sus cromosomas empleando el IC y RCL. Reportó 18 pares cromosómicos acrocéntricos, 10 pares submetacéntricos y 8 metacéntricos para alpaca y 16 pares acrocéntricos, 11 submetacéntricos y 9 metacéntricos para llama. Este es la primera investigación en reportar diferencia en la morfología de dos pares cromosómicos (34 y 35) entre especies de camélidos.
- Descailleaux (2018) al realizar un estudio comparativo de mutaciones estructurales entre llamas y alpacas, analizó la morfología

cromosómica empleando el IC y RCL, obtuvo los mismos resultados de Ramos (2014) en cuanto a la cantidad de cromosomas por morfología en alpacas. En llamas fue muy similar, siendo la única diferencia el par 34, reportándolo como subtelocéntrico, a diferencia de Ramos (2014) quien reportó el mismo par como submetacéntrico. Adicionalmente, corroboró la diferencia morfológica del par 35 entre alpacas y llamas.

En el caso de la morfología los cromosomas sexuales, el cromosoma X ha sido el más asertivo, ya que se ha reportado generalmente como metacéntrico (Bianchi *et al* 1986, Di Berardino *et al.*, 2006, Balmus *et.al.*,2007, Ramos, 2014); a diferencia del cromosoma Y, el cual ha sido descrito como metacéntrico (Koulischer *et al.*, 1971; Bunch *et al.*, 1985, Di Berardino *et al.*, 2006, Balmus *et.al.*,2007 y Ramos, 2014) y como acrocéntrico (Bianchi *et al.*, 1985 y Marín *et al.*, 2007, Avila *et al* 2012).

Estas discrepancias demuestran que aún existe duda acerca de la morfología de los pares cromosómicos del cariograma de llama y de las demás especies de camélidos, situación acontecida muy posiblemente por el elevado grado de dificultad en el análisis citogenético como consecuencia al alto número cromosómico y la presencia de una gran cantidad de cromosomas de pequeña longitud (Ramos, 2014).

2.5.2. BANDEOS CROMOSÓMICOS

Las primeras investigaciones con marcación cromosómica, reportaron una gran similitud entre los cariotipos de las especies de camélidos y en los patrones de diferenciación longitudinal del tipo GTG, CBG y NORs (6

pares de cromosomas), con lo cual se reforzó la idea de un cariotipo único extremadamente conservado en los camélidos (Bunch *et al.*, 1985, Bianchi *et al.*, 1985).

Posteriormente, Di Berardino *et al.* (2006) realizaron un estudio en cromosomas prometafasicos, solamente en alpaca, donde emplearon tres técnicas adicionales a las ya evaluadas: QFQ, RBG y RBA; como resultado elaboraron por primera vez 2 idiogramas de banda G y R, este último con una resolución de 391 bandas.

De otro lado, Balmus *et al.* (2007) reportan el idiograma de bandas G de dromedario y mediante el uso de sondas moleculares demostraron la similitud genética de esta especie con el camello, guanaco y un híbrido guanaco-dromedario. Como resultado se observó una variación solamente en el tamaño del bloque de heterocromatina en los brazos cortos de 20 pares de cromosomas autosómicos entre el dromedario y el guanaco, sustentaron que se debía a la posibilidad de que las regiones de heterocromatina están menos conservadas que las de eucromatina.

Avila *et al.* (2012) para desarrollar marcadores moleculares de todo el genoma de la alpaca, elaboraron un idiograma de bandas G, el cual fue adaptado del reportado por Balmus *et al.* (2007) con variaciones en los pares cromosómicos 12, 24, 26, 27, 29, 33 y en el cromosoma sexual Y.

Marín *et al.* (2007) publican uno de los aportes más significativos encontrados con la técnica GTG; la existencia de una diferencia en el patrón de bandeo G en el brazo corto del cromosoma 1 entre los CSA silvestres y domésticos. Se basaron en la visualización de una banda G+ terminal (1p13) en guanacos y llamas, en contraste con vicuñas y alpacas

que mostraron una banda G- terminal en la misma posición y una banda adicional oscura 1p12 cercana al centrómero (Figura 4). Adicionalmente, realizaron análisis moleculares de dos genes mitocondriales (Citocromo b y Dominio Hipervariable I de la Región Control) los cuales revalidan los resultados obtenidos por citogenética, que respalda fuertemente la hipótesis de que la llama se deriva de *L. guanicoe*, y la alpaca de *V. vicugna*, y la reclasificación de la alpaca como *V. pacos*.

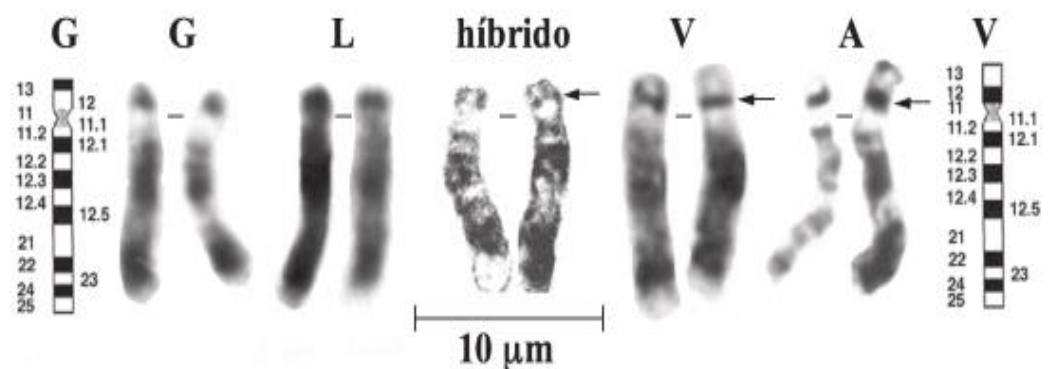


Figura 4: Bandas G en el par cromosómico 1 de camélidos sudamericanos. Donde se evidencia el diferente patrón de bandas G en el brazo corto. (G = guanaco; L= llama; V = vicuña; A = alpaca). Fuente: Marín et al., 2007.

Ramos (2014), a fin de aportar conocimientos citogenéticos de la alpaca y llama, empleo las técnicas de marcación cromosómica RBA, CBG y CBA. Con la técnica RBA demostró la similitud entre los cariotipos exceptuando a los pares cromosómicos 34 y 35 por su diferencia morfológica, siendo ambos subtelocéntricos en alpacas y submetacéntricos y metacéntricos, respectivamente, en llamas, resultado evidenciado también con coloración con Giemsa (Figura 5). En el caso de las otras dos técnicas, no se logró observar la diferencia entre los

pares 34 y 35 debido a que al ser tan pequeñas las bandas C, éstas no se apreciaban con claridad.

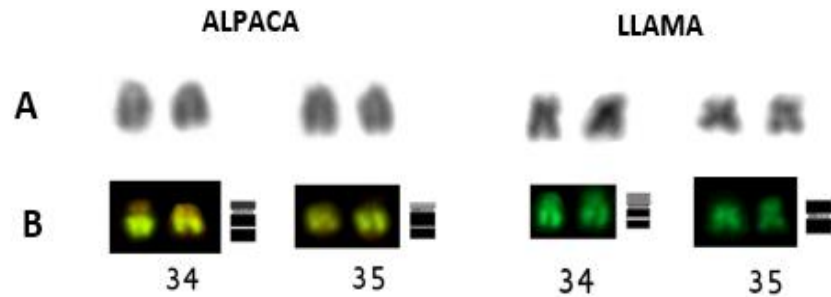


Figura 5: Pares cromosómicos 34 y 35 de alpaca y llama. Coloreados con Giemsa (A) y tratados con la técnica RHG (B) estos últimos con sus respectivos idiogramas. Fuente: Ramos (2014).

Descailleaux (2018), además de corroborar la diferencia morfológica del par cromosómico 35 entre llamas y alpacas propuesto por Ramos (2014), reporta la existencia de dos tipos de cromosomas 1, tipo a y tipo b, en camélidos domésticos resultado observado con las técnicas de bandeo GTG y RHG. El cromosoma 1 tipo a se observó solo en alpacas, en cambio el cromosoma 1 tipo b se encontró tanto en alpacas como llamas (Figura 6). Con estos resultados, Descailleaux es el primero en reportar heteromorfismo cromosómico en camélidos, específicamente en alpacas. Encontró que pueden conformar las tres combinaciones posibles del cromosoma 1: aa, ab y bb, en proporciones aún no determinadas, a diferencia de las llamas, que solo presentaron el par cromosómico 1 homomórfico bb (Figura 7).

De estas investigaciones se puede destacar que hasta la fecha no existe reporte del idiograma de bandas G de la especie llama, perjudicando la elaboración de su nomenclatura cromosómica.











| TÉCNICA GTG | | | TÉCNICA RHG | | |
|-------------|---|---|-------------|---|---|
| CROMOSOMA 1 | ALPACA | ESQUEMA | CROMOSOMA 1 | ALPACA | ESQUEMA |
| TIPO : a |  |  | TIPO a |  |  |
| TIPO : b | LLAMA | ALPACA | TIPO b | LLAMA | ALPACA |
| |  |  | |  |  |
| | | ESQUEMA | | | ESQUEMA |
| | |  | | |  |

Figura 6: Pares cromosómicos 1 tipo a y tipo b de alpacas y llamas. Con el tratamiento GTG y RHG. Fuente: Descailleaux (2018).




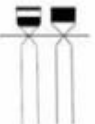



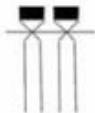
| ALPACA | | | |
|---|---|---|---|
| ab | ab | ab | ESQUEMA |
|  |  |  |  |
| LLAMA | | | |
| bb | bb | bb | ESQUEMA |
|  |  |  |  |

Figura 7: Distribución heteromórfica (ab) y homomórfica (bb) del cromosoma 1p en alpacas y llamas. Con el tratamiento GTG y sus esquemas. Fuente: Descailleaux (2018).

2.5.3. CITOGENÉTICA MOLECULAR

La citogenética ha sido empleada con éxito en diferentes áreas de investigación como evolución, taxonomía y genética médica, sin embargo, presenta limitantes, siendo mayores en algunas especies como los camélidos, debido a la complejidad de su cariotipo. Ante esto, diversos autores han empleado la técnica FISH como una solución eficaz y precisa.

Di Berardino *et al.* (2006) emplearon sondas específicas de cromosomas X e Y de camello (*Camelus dromedarius*) para identificar los cromosomas sexuales de alpaca (X metacéntrico más grande, Y metacéntrico más pequeño) corroborando su cercana homología de los mismos entre estas dos especies. Adicionalmente, encontraron presencia de secuencias de ADN del cromosoma Y en el brazo p del cromosoma X; recomiendan la realización de más estudios que determinen una posible translocación.

Balmus *et al.* (2007) mediante el empleo de sondas cromosómicas específicas de dromedario, caracterizaron los cariotipos del dromedario, camello, guanaco, la alpaca y de un híbrido guanaco- dromedario (todos con $2n = 74$), lograron el establecimiento del cariograma con bandeo GTG de alta resolución, junto con la nomenclatura cromosómica y el idiograma para *C. dromedarius*, revelaron que estas especies de camélidos tienen cariotipos casi idénticos, con solo pequeñas variaciones en la cantidad y patrones de distribución de heterocromatina. Además, construyeron un mapa cromosómico comparativo de todo el genoma del camello, vacas, cerdo y humano con sondas cromosómicas de camello y humano, reportaron que entre humanos y camellos, cerdos y camellos, y bovinos y

camellos existen 48, 54 y 54 segmentos conservados entre los cromosomas autosómicos y el cromosoma sexual X, respectivamente.

Ávila *et al.* (2012) desarrollaron el primer mapa citogenético para el genoma de alpaca empleando la información humano-camello ZOO-FISH reportada por Balmus *et al.* (2007). Identificaron 151 clones del cromosoma artificial bacteriano de alpaca (BAC) correspondientes a 44 genes específicos mapeados a 31 autosomas y los cromosomas sexuales de alpaca. Adicionalmente, fueron los primeros en realizar aportes a la citogenética clínica en camélidos, ya que, gracias a los marcadores específicos que obtuvieron, lograron identificar a LPA20 (complejo mayor de histocompatibilidad) como parte de una translocación autosómica en una llama masculina estéril. Igualmente, mediante el empleo de las sondas LPAX BACs y LPA36 investigaron el origen de un cromosoma anormalmente pequeño denominado minute en alpacas femeninas infértiles.

Mendoza *et al.* (2019) lograron mapear genes candidatos de alpaca para el crecimiento y el color de las fibras mediante hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH). Ellos obtuvieron que los genes candidatos para el crecimiento de fibras COL1A1, CTNNB1, DAB2IP, KRT15, KRTAP13-1 y TNFSF12 se localizan en los cromosomas 16, 17, 4, 16, 1 y 16, respectivamente. Los genes candidatos para el color de fibra ALX3, NCOA6, SOX9, ZIC1 y ZIC5 se encuentran en los cromosomas 9, 19, 16, 1 y 14, respectivamente.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNA:

La aplicación de la técnica de bandeo cromosómico GTG en cromosomas prometafásicos de *Lama glama* permitirá la caracterización longitudinal del patrón de bandas G de la especie.

HIPÓTESIS NULA:

La aplicación de la técnica de bandeo cromosómico GTG en cromosomas prometafásicos de *Lama glama* no permitirá la caracterización longitudinal del patrón de bandas G de la especie.

3.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas prometafásicos de llama mediante la técnica GTG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer la morfología de los 36 pares cromosómicos autosómicos y del par sexual de llama.
- Ordenar los pares cromosómicos de la llama y proponer su cariograma por coloración con Giemsa.
- Determinar el patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas prometafásicos de llama para su identificación individual.
- Proponer el cariograma de bandas G de llama.

- Diseñar el ideograma por bandas G de los cromosomas prometafásicos de llama.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. POBLACIÓN ESTUDIADA

Se trabajó un total de 21 llamas clínicamente sanas y fértiles, seleccionadas por el médico veterinario del lugar, de las cuales: 11 (6 machos y 5 hembras) procedentes de la hacienda Acopalca (A) Distrito y Provincia de Huancayo - Región Junín y 10 llamas (2 machos y 8 hembras) eran provenientes del centro poblado de Huari (H), Distrito de Acoria, Región de Huancavelica.

4.1.2. EQUIPOS

- Baño María
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Estufa
- Potenciómetro
- Refrigeradora
- Congeladora
- Termómetro de mercurio
- Vortex
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio óptico con cámara fotográfica y software incorporados.

4.1.3. INSUMOS

- Láminas portaobjeto de vidrio
- Laminillas cubreobjeto
- Pipetas Pasteur
- Tubos al vacío con heparina sódica
- Chupones para pipetas Pasteur
- Lápiz diamante
- Tubos centrífuga estériles de 15 ml
- Pinzas
- Mechero

4.1.4 REACTIVOS

CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

4.1.4.1. SIEMBRA

- Medio de cultivo 199 (1X). Gibco. Código 12340-030.
- Concanavalina A. Sigma. Código C-2010.
- Suero bovino fetal. Gibco. Código 16000-036.
- Penicilina-Estreptomicina. Gibco. Código 15140-122.
- Antibiótico-Antifúngico (100x). Gibco. Código 15240-062.
- 5-BrdU. Sigma. Código B-5002.
- Heparina sódica (5000 UI / 1ml). Veinfar.

4.1.4.2. PREPARACIÓN CITOLÓGICA

- Ácido acético (glacial) 100%. Merck. Código 100063
- Colchicina 0.5 mg. Farindustria.
- Etanol absoluto. Merck. Código 100983.
- KCL. Merck. Código 104936.

4.1.4.3. COLORACIÓN CON GIEMSA

- Giemsa en polvo. Merck. Código 109203.
- Metanol. Merck. Código 106009.
- Glicerol. Sigma. Código G2025.

4.1.4.4. TECNICA DE BANDEO GTG

- Tripsina (1:250). Gibco. Código: 27250018
- Suero fisiológico. BRAUN.
- Fosfato de potasio monobásico. J.T.BAKER. Código: 3246.

4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas por el médico veterinario. A cada uno de los animales seleccionados se les realizó una punción en la vena yugular con aguja estéril, previamente se desinfectó el área específica. Se recolectó 10 mL de muestra a cada individuo e inmediatamente se transvasó a un tubo Vacutainer que contenía heparina sódica como anti-coagulante. Se homogenizó la muestra a través de la

inversión del tubo por varios segundos. Los tubos con las muestras fueron mantenidas a 4°C por no más de 24 horas, en caso no pudieran ser trabajadas el mismo día.

4.2.2. CULTIVO DE LINFOCITOS

Se trabajó según la metodología reportada por Ramos (2014), con ligeras variaciones.

4.2.2.1. SIEMBRA

En un tubo centrifuga estéril con tapa rosca de 15 ml, rotulado adecuadamente, se adicionaron los siguientes reactivos:

- 6 ml de medio de cultivo TC 199
- 220 µl de concanavalina A (1mg/mL)
- 2 ml de suero bovino fetal SBF
- 50 µl de estreptomicina
- 50 µl de anti-anti (penicilina- estreptomicina)
- 2 gotas de Heparina sódica
- 1 ml de sangre total previamente homogenizada por inversión.

Los tubos se incubaron a 37 °C por 72 horas en la estufa. A las 66 horas de realizada la siembra, se les adicionó 165 µl de 5-BrdU (1mg/ml) a cada tubo.

4.2.2.2. PREPARACIÓN CITOLÓGICA

La preparación citológica, consta de pasos muy importantes, tales como la colchinización, hipotonización, fijación y lavados. Se detalla a continuación:

- 1) A las 72 horas de realizado el cultivo, se agregó 120 μ l de colchicina (1 μ g/ml) y se dejó incubar a 37°C por 30 minutos.
- 2) Se centrifugó a 400 g por 10 minutos.
- 3) Se eliminó el sobrenadante, conservando el pellet; se agregó 10 ml de solución hipotónica KCL (0.075 M), se homogenizó y se incubó a 37°C por 20 minutos.
- 4) Se agregó 1 ml de solución Carnoy (3 vol. de etanol: 1 vol. de ácido acético); éste debe ser recientemente preparado. Se homogenizó con ayuda de una pipeta Pasteur.
- 5) Se centrifugó a 400 g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó Carnoy hasta 7 ml y se homogenizó.
- 6) Los tubos se mantuvieron refrigerados a 4°C por 30 minutos para fijar las células con la solución Carnoy.
- 7) Se centrifugó a 400 g por 10 minutos y se retiró el sobrenadante.
- 8) Se realizaron dos lavados adicionando 5 ml de Carnoy en cada lavado e inmediatamente se descartó el sobrenadante. Se agregó 5 ml de Carnoy fresco y se dejó en refrigeración a 4°C por toda la noche.
- 9) Al día siguiente, se realizaron tres lavados más con Carnoy agregando en cada uno de ellos 3 ml.

10) Después de descartar el sobrenadante del ultimo lavado, se agregó Carnoy fresco hasta 0.5 ml y se homogenizó, dejando lista la muestra para la preparación de láminas.

4.2.2.3. PREPARACIÓN DE LÁMINAS

Las láminas portaobjetos fueron lavadas con detergente alconox, enjuagadas bajo el chorro agua corriente hasta estar seguros que no queda nada del alconox. Luego, un último lavado se realizó con agua destilada. Las láminas fueron sumergidas en una solución de agua destilada con alcohol (2:1) y se colocan a congelar en couplins.

En láminas recientemente retiradas de la congelación y desde una altura de 30 cm se dejó gotear 3 a 4 gotas de la suspensión. Inmediatamente después, las láminas con las muestras se secaron flameándolas en un mechero.

4.2.2.4. TÉCNICA DE BANDEO CROMOSÓMICO GTG

1) Las láminas preparadas se deshidrataron a 37°C por 3 días en la estufa.

2) Después de este tiempo, las láminas se colocaron en un coupling con solución de tripsina al 0.1% (previamente calentada a 37°C en baño María) por 10 segundos en agitación.

3) Inmediatamente se retiraron las láminas de la tripsina y se enjuagaron en agitación con suero fisiológico, se secan y se colorean con Giemsa.

4.2.2.5. COLORACIÓN CON GIEMSA

Tanto las láminas empleadas para evaluar los cromosomas con coloración con Giemsa y las sometidas a la técnica GTG se colorearon con Giemsa al 2% por 10 minutos, se enjuagaron con agua de caño y se dejaron secar para su observación al microscopio.

4.2.3. TOMA DE FOTOGRAFÍAS

Se fotografiaron las metafases que presentaban cromosomas elongados y sin superposiciones que perjudiquen el análisis. Se trabajó con el programa LAS V4.12 marca Leica para la captación de imágenes de las metafases coloreadas con Giemsa y el programa Cytovision marca Leica para las metafases tratadas por la técnica GTG. Posteriormente se editaron con los programas Photoshop CS6 y Microsoft Picture Office.

4.2.4. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS

La confección de todos los cariogramas se realizó con el programa Photoshop CS6.

4.2.4.1. METAFASES COLOREADAS CON GIEMSA

La confección del cariograma de una metafase tratada con coloración con Giemsa se realizó de la siguiente manera: los cromosomas se aparearon de modo que la morfología coincidía entre los cromosomas homólogos, luego estos pares cromosómicos se ordenaron por tamaño decreciente según lo observado a simple vista. A continuación se procedió a medir los cromosomas de la metafase empleando el programa KaryoType 2.0 como se detalla a continuación:

Se trazaron líneas rectas por el centro de cada cromátide respetando las regiones donde se presentaban pliegues o curvas, de tal manera que se logró medir, por separado, cada brazo cromosómico (pter→centrómero y centrómero→qter) de ambas cromátides hermanas de los 74 cromosomas. Se obtuvo 4 medidas por cromosoma y 8 por par cromosómico. Estas medidas se ordenaron en una tabla que se empleó para estimar la longitud relativa del cromosoma y el índice centromérico. Este último permitió la clasificación de los cromosomas por morfología en metacéntricos, submetacéntricos, subtelocéntricos y telocéntricos, según las siguientes fórmulas publicadas por Levan *et al.* (1964):

A) Cálculo de la longitud relativa del cromosoma (RCL)

$$RCL = \frac{\text{Longitud del cromosoma analizado} \times 100}{\text{Suma de la longitud de todos los cromosomas}}$$

B) Cálculo del índice centromérico (IC)

$$IC = \frac{\text{Longitud del brazo corto} \times 100}{\text{Longitud total del cromosoma}}$$

❖ Clasificación morfológica según el IC:

Metacéntrico: 0.50-0.38

Submetacéntrico: 0.37-0.26

Subtelocéntrico: 0.25-0.13

Telocéntrico: 0.12-0

Se midió en total 20 metafases coloreadas con Giemsa (5 por individuo) lo que resultó en un total de 20 tablas de medidas. Luego se promediaron todos los valores de RCL e IC en todas estas tablas. Por último, se corrigió la ubicación de los cromosomas en los cariogramas de acuerdo a los valores promedios de IC y RCL de cada par cromosómico de tal manera que quedaron ordenados de mayor a menor longitud.

4.2.4.2. METAFASES TRATADAS CON LA TÉCNICA GTG

Los cromosomas se aparearon en consideración que los cromosomas homólogos presenten el mismo patrón de bandas y se ordenaron según la morfología previamente determinada con las medidas de las metafases coloreadas con Giemsa.

4.2.5. CONFECCIÓN DE IDIOGRAMA

Se realizó con el programa AdobeIllustratorCS6. La determinación del nivel de resolución de bandeo se realizó por el conteo de todas las bandas G+ y G- observadas en el juego haploide, se incluyó a los cromosomas sexuales X e Y tal como describe El Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana - ISCN (2016).

5. RESULTADOS

5.1. COLORACIÓN CON GIEMSA

5.1.1. PARÁMETROS MÉTRICOS IC Y RCL

Los valores promedio de los parámetros métricos IC y RCL de las 20 metafases analizadas por coloración con Giemsa se muestran en la Tabla 1.

En Anexos (Tabla 4) se muestran todas las medidas y los valores RCL y IC obtenidos de una metafase, en un individuo llama analizada por coloración con Giemsa.

Tabla 1: Estimativa promedio de la longitud relativa del cromosoma (RCL) y el índice centromerico (IC). Valores obtenidos de las metafases analizadas luego de la coloración con Giemsa.

| PAR CROMOSÓMICO | RCL PROMEDIO | IC PROMEDIO | PAR CROMOSÓMICO | RCL PROMEDIO | IC PROMEDIO |
|-----------------|--------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|
| 1 | 5.51 | 0.20 | 20 | 2.24 | 0.40 |
| 2 | 5.05 | 0.17 | 21 | 2.18 | 0.33 |
| 3 | 4.83 | 0.16 | 22 | 2.05 | 0.36 |
| 4 | 4.27 | 0.20 | 23 | 1.97 | 0.39 |
| 5 | 3.98 | 0.20 | 24 | 1.87 | 0.33 |
| 6 | 3.82 | 0.18 | 25 | 1.82 | 0.38 |
| 7 | 3.60 | 0.19 | 26 | 1.75 | 0.32 |
| 8 | 3.46 | 0.22 | 27 | 1.75 | 0.38 |
| 9 | 3.35 | 0.19 | 28 | 1.70 | 0.29 |
| 10 | 3.15 | 0.24 | 29 | 1.64 | 0.27 |
| 11 | 3.10 | 0.26 | 30 | 1.62 | 0.39 |
| 12 | 3.04 | 0.23 | 31 | 1.56 | 0.34 |
| 13 | 2.94 | 0.25 | 32 | 1.48 | 0.28 |
| 14 | 2.87 | 0.42 | 33 | 1.45 | 0.34 |
| 15 | 2.78 | 0.21 | 34 | 1.36 | 0.24 |
| 16 | 2.64 | 0.44 | 35 | 1.32 | 0.45 |
| 17 | 2.62 | 0.28 | 36 | 1.20 | 0.44 |
| 18 | 2.48 | 0.37 | X | 4.44 | 0.43 |
| 19 | 2.39 | 0.43 | Y | 1.11 | 0.43 |

De los valores de RCL promedio de la Tabla 1 podemos resaltar que el cromosoma 1 contiene casi el 6% del genoma de la llama en su brazo largo al poseer una morfología subtelocéntrica, mientras que el cromosoma Y es el metacéntrico más pequeño con apenas el 1% del genoma; el cromosoma X, el metacéntrico más grande, le corresponde un 4.4% del genoma.

5.1.2. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

Los valores promedios de IC mostrados en la Tabla 1 permitieron establecer la morfología de los pares cromosómicos de la llama en 14 subtelocéntricos (10 grandes, 3 medianos y 1 pequeño); 12 submetacéntricos (1 grande, 2 medianos y 9 pequeños) y 10 metacéntricos (2 medianos y 8 pequeños) y los cromosomas sexuales X e Y, ambos metacéntricos.

La clasificación y especificación de cada par cromosómico según su morfología se muestra en la Tabla 2. Se resalta la ausencia de cromosomas telocéntricos en la llama.

Tabla 2: Clasificación y cantidad total por morfología de los 36 pares autosómicos y el par sexual de la llama.

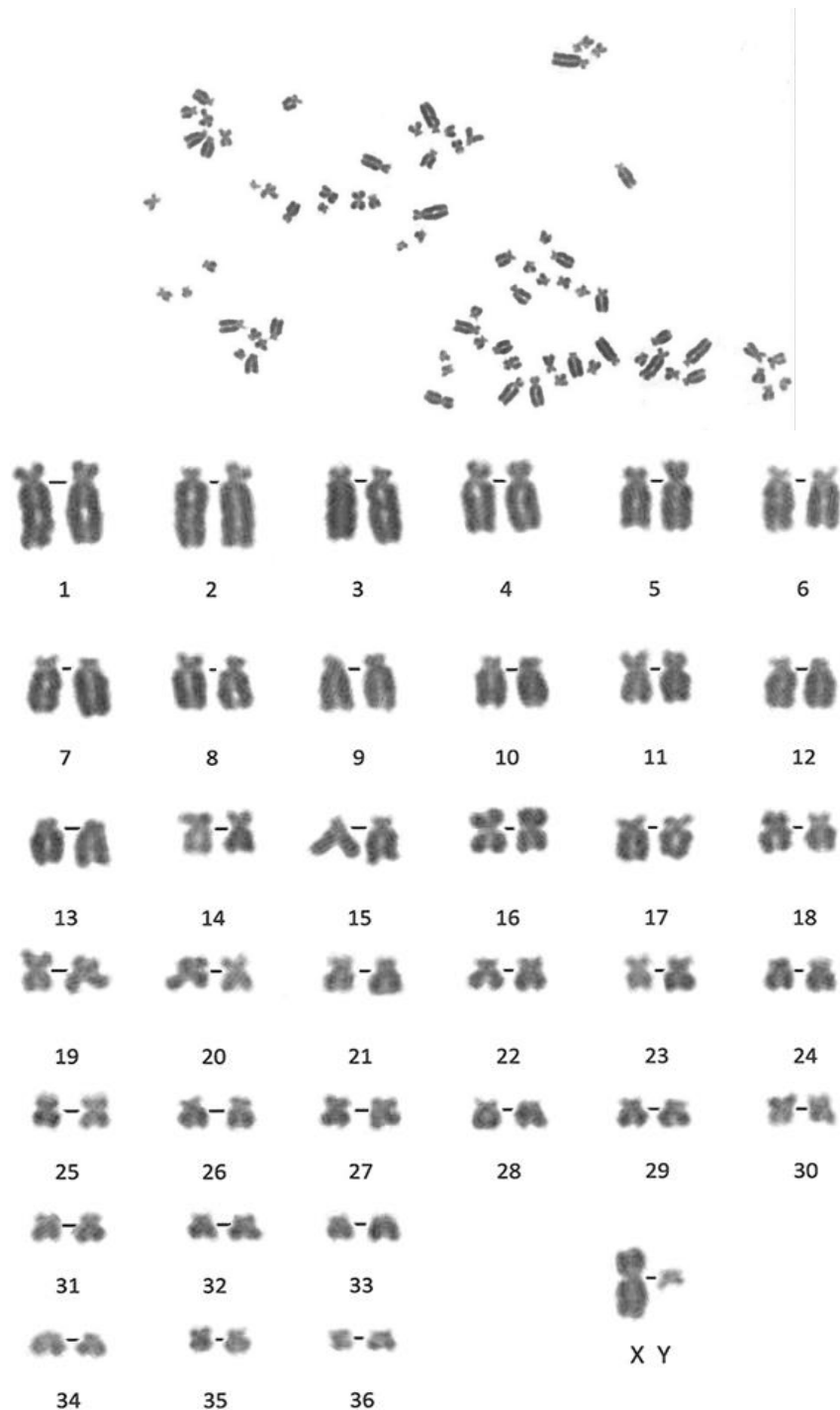
| TIPO | PARES CROMOSÓMICOS | TOTAL PARES |
|------------------------|--|----------------|
| METACÉNTRICO | 14,16,19,20,23,25,27,30,35,36,X,Y | 10, X,Y |
| SUBMETACÉNTRICO | 11,17,18,21,22,24,26,28,29,31-33 | 12 |
| SUBTELOCÉNTRICO | 1-10, 12,13,15,34 | 14 |
| TELOCÉNTRICO | - | 0 |

5.1.3. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS

Se usó como guía las Tablas 1 y 2, se reordenaron los pares cromosómicos y se obtuvo los 20 cariógramas definitivos por coloración con Giemsa, algunos ejemplos se muestran en Anexos (Figuras 18 al 23). Estos cariógramas también permitieron constatar el número diploide de la llama en $2n=74$ y su patrón de diferenciación sexual de tipo XX/XY.

Una dificultad presenciada durante esta etapa fue la similitud de morfología y tamaño en algunos pares cromosómicos, sin embargo, gracias a sus valores promedio de IC (Tabla 1), se logró diferenciarlos. Por ejemplo, los pares 14 y 16, ambos son metacéntricos, no obstante, el IC del 16 es ligeramente mayor, por lo que se observa más metacéntrico que el 14, esto mismo ocurre con los pares 19 y 20, el cromosoma 19 presenta el mayor valor de IC por lo que se observa más metacéntrico que el 20. En el caso de los pares 17 y 18, la diferencia entre sus IC se hace más notoria, por lo que a pesar que ambos son submetacéntricos, el cromosoma 17 se observa más acrocéntrico.

El cariógrama basado en el análisis por coloración con Giemsa propuesto en este estudio como modelo de la especie *Lama glama* se muestra en la Figura 8.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 8: Metafase coloreada con Giemsa de la llama ♂ 10-A y su cariograma. Cariograma propuesto, en este estudio, como modelo de la especie *Lama glama*. Se puede observar el ordenamiento de sus cromosomas por longitud decreciente y morfología según las Tablas 1 y 2.

5.2. TÉCNICA GTG

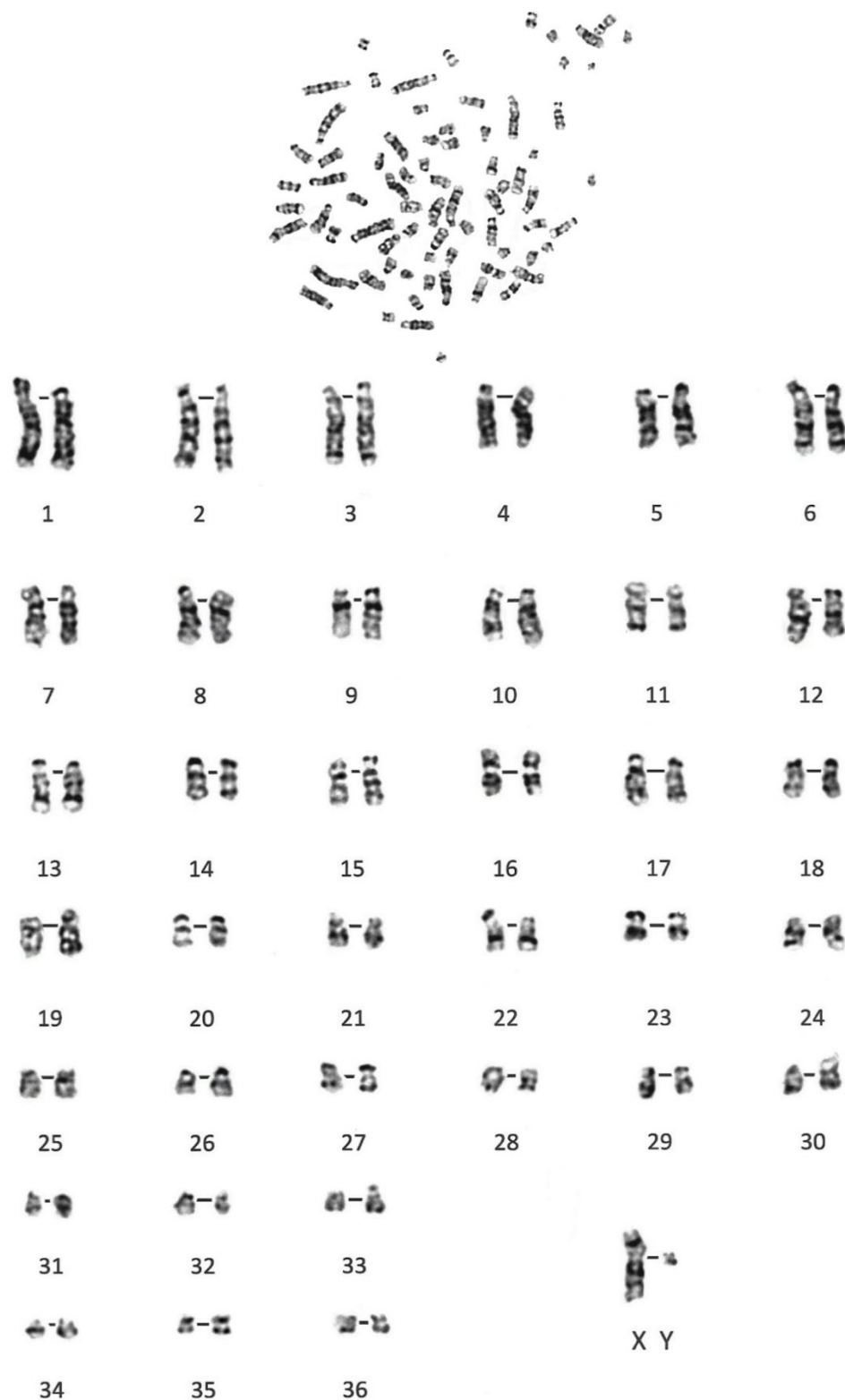
5.2.1. CONFECCIÓN DE CARIOGRAMAS

Para la confección de los cariogramas de las 53 metafases analizadas mediante la técnica GTG se empleó como modelo el cariograma propuesto por coloración con Giemsa (Figura 8) guiándose de la morfología de cada par cromosómico y su ubicación.

El emparejamiento de los cromosomas homólogos fue posible gracias al buen contraste entre bandas G+ y G-, que permitió una rápida y fácil visualización de la secuencia de bandas por cromosoma.

El buen bandeo también facilitó visualizar la morfología del cromosoma coincidiendo con la morfología determinada previamente por coloración con Giemsa, también permitió la caracterizar e identificar cada par cromosómico según su secuencia de bandas G y no solo por la posición de su centrómero.

En la Figura 9 se muestra el cariograma con bandas G modelo de la especie *Lama glama* propuesto en este estudio. Otros ejemplos de cariogramas por bandas G obtenidos en este trabajo se encuentran en Anexos (Figuras 24 al 29).



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

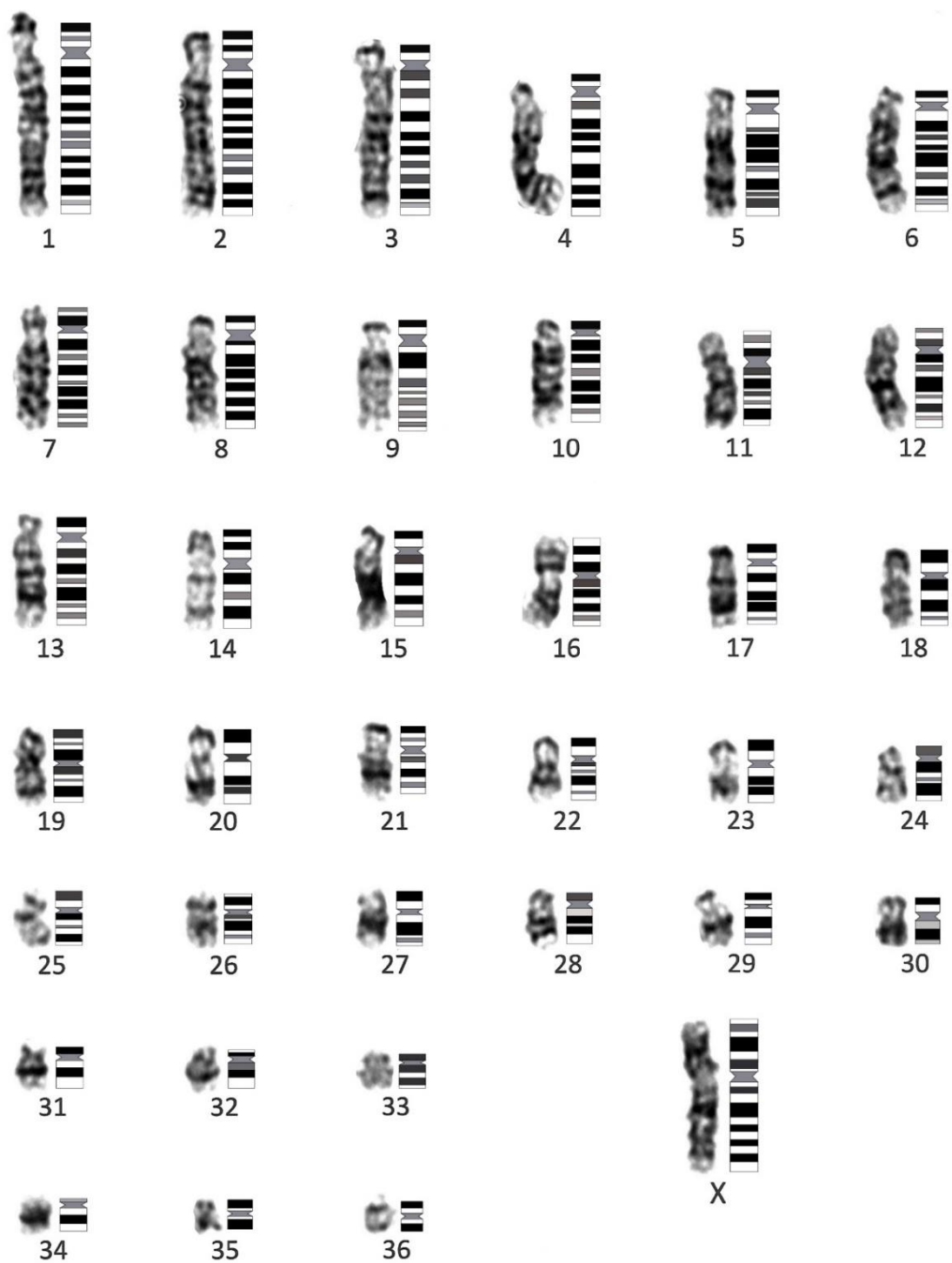
Figura 9: Metafase con bandas G de la llama ♂ 1-A y su cariograma. Cariograma propuesto en este estudio como modelo de la especie *Lama glama*.

5.2.2. DISEÑO DE IDIOGRAMAS

Al comparar todos los cariogramas, tratados para la obtención de bandas G, y evidenciarla similitud de sus patrones de bandas a los de la Figura 9, se elaboró un idiograma estándar, denominado idiograma 1. Para una mejor visualización, en la Figura 10 se representa este idiograma 1 en el cariograma haploide de una llama hembra y en la Figura 11, en el de un macho.

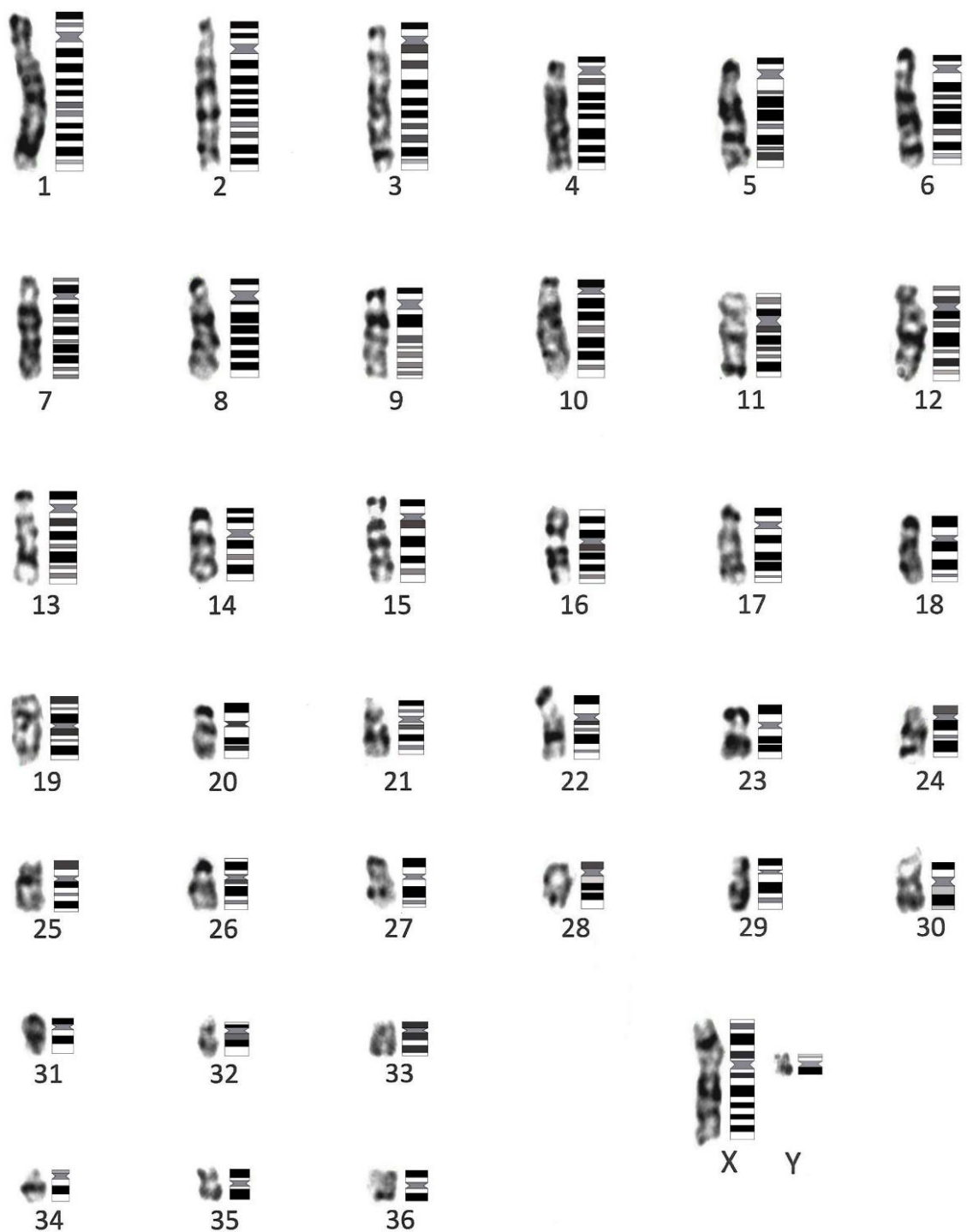
Debido a que entre, las metafases trabajadas, se observó la presencia de otro grado de elongación cromosómica (cromosomas más condensados), y al tener conocimiento de la pequeña longitud de los cromosomas en camélidos, se logró elaborar, con las metafases con cromosomas más cortos pero analizables, un segundo idiograma, que se le denominó Idiograma 2. Ese Idiograma está representado en el cariograma haploide de una llama macho (Figura 12). Se considera que este resultado va ayudar en un futuro a definir la nomenclatura de bandas para esta especie.

En Anexos (Figura 30) se observa la similitud de secuencias de bandas entre los mismos cromosomas de diferentes metafases y también la correspondencia de estas con los dos idiogramas diseñados en este trabajo.



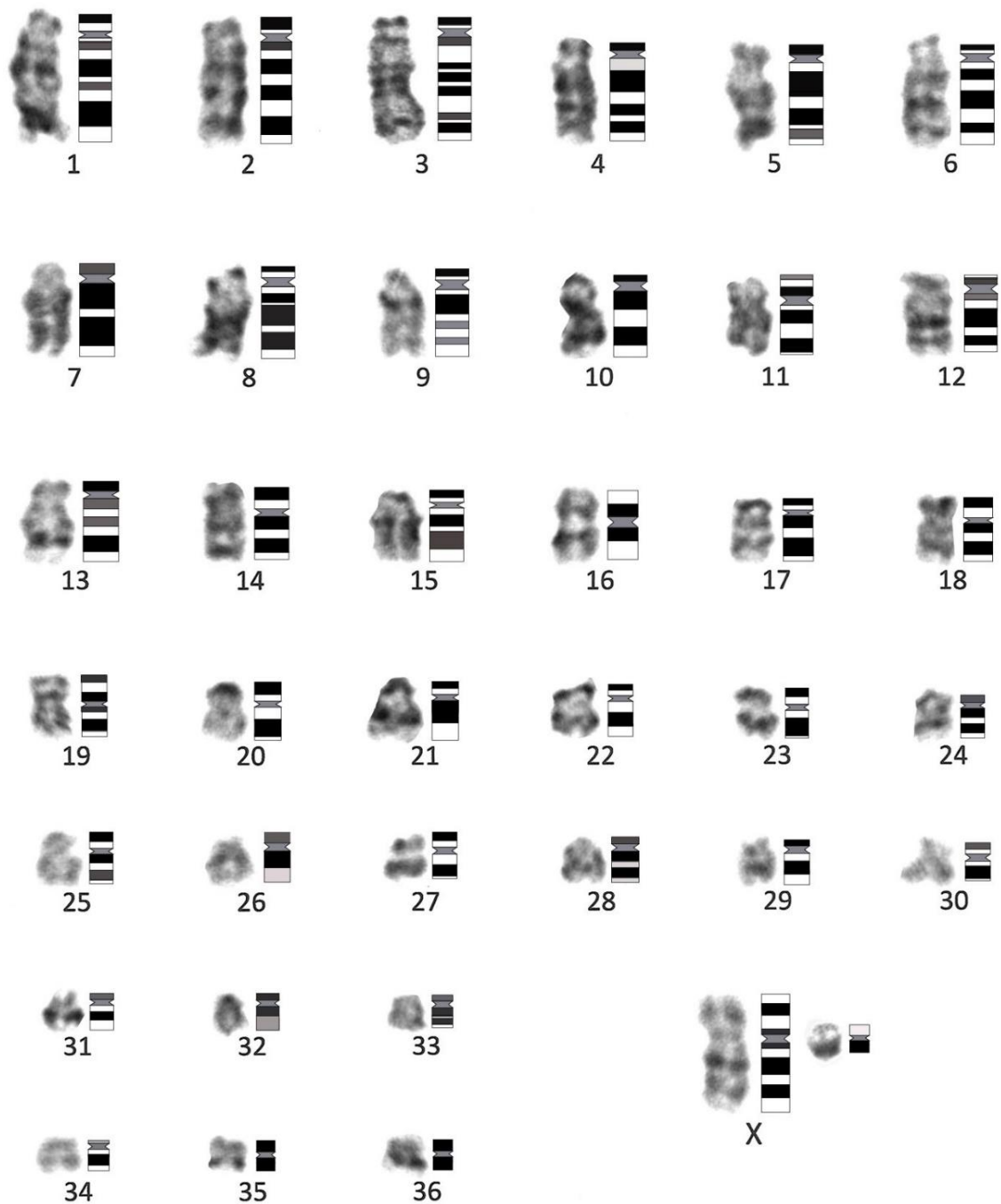
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 10: Cariograma haploide de la llama ♀ 3-A y el Idiograma 1 de bandas G al nivel de resolución de 420 bandas.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 11: Cariograma haploide de la llama ♂ 1-A y el Idiograma 1 de bandas G al nivel de resolución de 420 bandas.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 12: Cariograma haploide de la llama ♂ 11-A y el Idiograma 2 de bandas G al nivel de resolución de 231 bandas.

5.2.3. NIVEL DE RESOLUCIÓN DE BANDAS G

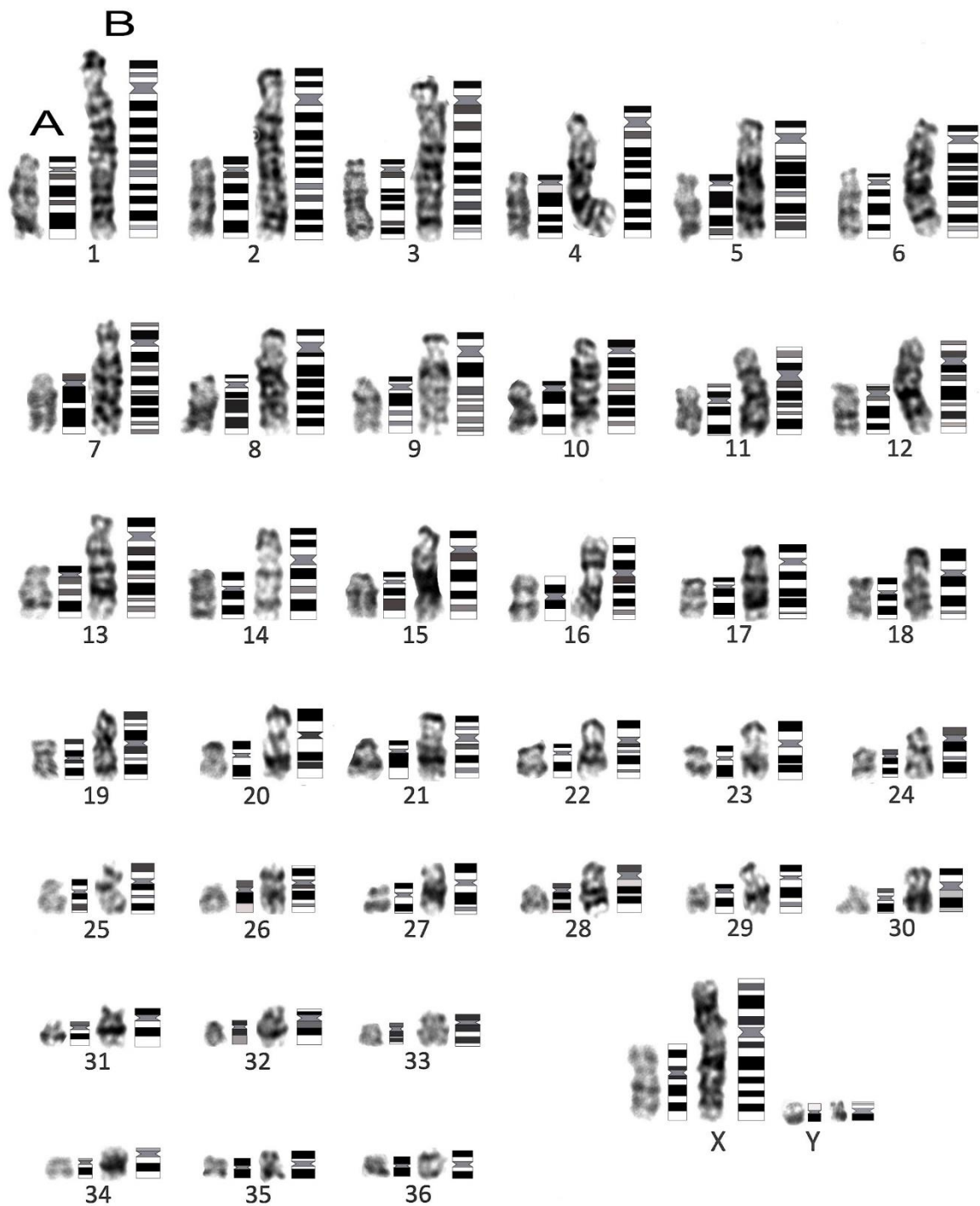
En la Tabla 3 se muestran el número de bandas G por brazo cromosómico y por cromosoma de los Idiogramas 1 y 2 (Figuras 10, 11 y 12). La suma del número de bandas de los brazos p y q de todos los cromosomas autosómicos y sexuales del Idiograma 1 es de 94 y 326 respectivamente, lo cual resulta en un nivel de resolución de 420 bandas G. Para el Idiograma 2 la suma de las bandas de los brazos p de todos los cromosomas es de 64 y 167 respectivamente, lo que resulta en un nivel de resolución de 231 bandas G.

Al juntar los cromosomas e idiogramas de las Figuras 10,11 y 12 a un mismo aumento fotográfico (Figura 13) se observa una notable diferencia de condensación cromosómica, donde los cromosomas de la Figura 10 y 11 presentan el doble de tamaño que los de la Figura 12, concordando con los niveles de resolución obtenidos. Por lo tanto, se valida la obtención de cromosomas prometafásicos (Figuras 10 y 11) y metafásicos (Figura 12).

De la Tabla 3 también se puede resaltar que los pares cromosómicos 30, 31, 33 y 34 tienen la misma cantidad de bandas G en ambos niveles de resolución, y solo presentan diferencia de longitud como se aprecia en la Figura 13.

Tabla 3: Cantidad de bandas G por brazo cromosómico y por cromosoma de llama. Calculados de los Idiogramas 1 y 2.

| CANTIDAD DE BANDAS G | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|-----|-----------------|----------------|-----------------|-----|-----------------|
| IDIOGRAMA 1 | | | | IDIOGRAMA 2 | | | |
| CROMO -SOMA | BANDAS BRAZO | | TOTAL BANDAS | CROMO -SOMA | BANDAS BRAZO | | TOTAL BANDAS |
| | p | q | | | p | q | |
| 1 | 4 | 21 | 25 | 1 | 2 | 9 | 11 |
| 2 | 4 | 19 | 23 | 2 | 2 | 8 | 10 |
| 3 | 2 | 18 | 20 | 3 | 2 | 12 | 14 |
| 4 | 2 | 15 | 17 | 4 | 1 | 7 | 8 |
| 5 | 2 | 15 | 17 | 5 | 1 | 7 | 8 |
| 6 | 2 | 15 | 17 | 6 | 2 | 7 | 9 |
| 7 | 3 | 16 | 19 | 7 | 1 | 4 | 5 |
| 8 | 2 | 12 | 14 | 8 | 2 | 7 | 9 |
| 9 | 2 | 13 | 15 | 9 | 2 | 7 | 9 |
| 10 | 1 | 13 | 14 | 10 | 1 | 4 | 5 |
| 11 | 4 | 10 | 14 | 11 | 3 | 5 | 8 |
| 12 | 3 | 12 | 15 | 12 | 2 | 6 | 8 |
| 13 | 2 | 13 | 15 | 13 | 1 | 6 | 7 |
| 14 | 4 | 7 | 11 | 14 | 2 | 4 | 6 |
| 15 | 2 | 8 | 10 | 15 | 2 | 5 | 7 |
| 16 | 4 | 8 | 12 | 16 | 2 | 2 | 4 |
| 17 | 2 | 9 | 11 | 17 | 2 | 4 | 6 |
| 18 | 2 | 6 | 8 | 18 | 2 | 4 | 6 |
| 19 | 5 | 6 | 11 | 19 | 3 | 4 | 7 |
| 20 | 2 | 5 | 7 | 20 | 2 | 3 | 5 |
| 21 | 4 | 7 | 11 | 21 | 2 | 2 | 4 |
| 22 | 2 | 8 | 10 | 22 | 2 | 3 | 5 |
| 23 | 2 | 5 | 7 | 23 | 2 | 3 | 5 |
| 24 | 1 | 6 | 7 | 24 | 1 | 4 | 5 |
| 25 | 2 | 6 | 8 | 25 | 2 | 4 | 6 |
| 26 | 3 | 6 | 9 | 26 | 1 | 2 | 3 |
| 27 | 2 | 5 | 7 | 27 | 2 | 3 | 5 |
| 28 | 1 | 5 | 6 | 28 | 1 | 4 | 5 |
| 29 | 2 | 5 | 7 | 29 | 1 | 3 | 4 |
| 30 | 2 | 3 | 5 | 30 | 2 | 3 | 5 |
| 31 | 1 | 3 | 4 | 31 | 1 | 3 | 4 |
| 32 | 2 | 3 | 5 | 32 | 1 | 2 | 3 |
| 33 | 1 | 4 | 5 | 33 | 1 | 4 | 5 |
| 34 | 1 | 3 | 4 | 34 | 1 | 3 | 4 |
| 35 | 2 | 2 | 4 | 35 | 1 | 1 | 2 |
| 36 | 2 | 2 | 4 | 36 | 1 | 1 | 2 |
| X | 7 | 11 | 18 | X | 4 | 6 | 10 |
| Y | 3 | 1 | 4 | Y | 1 | 1 | 2 |
| TOTAL | 94 | 326 | 420 | TOTAL | 64 | 167 | 231 |



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 13: Comparación de los cromosomas e Idiogramas de bandas G a los niveles de resolución de 231 bandas (A) y 420 bandas (B). Mostrados en las figuras 10, 11 y 12.

5.2.4. VARIABLES DEL BRAZO CORTO DE LOS CROMOSOMAS 1 Y 5

Después de establecer las secuencias de bandas G más frecuentes, se observó variaciones en el patrón de bandeo G en el brazo corto en uno de los cromosomas homólogos de los pares cromosómicos 1 y 5, denominándolos como pares cromosómicos heteromórficos.

Para una mejor explicación de estos heteromorfismos, se enumeraron las bandas de los brazos cortos de los cromosomas 1 y 5 según ISCN (2016), dando la nomenclatura de bandas G preliminar.

✓ CROMOSOMA 1

Se observó dos secuencias de bandeo frecuentes en el brazo corto del cromosoma 1 (Figura 14):

- 1) En el primer patrón se observa una secuencia de dos bandas: G-proximal (1p12) seguida de una G+ terminal (1p13), en metafases con resolución de 231 bandas.

- 2) En el segundo patrón se observa una secuencia de 4 bandas: G-proximal al centrómero (1p12), seguido de una banda G+ intermedia (1p13.1), continuando con una G- subterminal (1p13.2) y terminando con una banda G+ terminal (1p13.3), observadas en las metafases con resolución de 420 bandas.

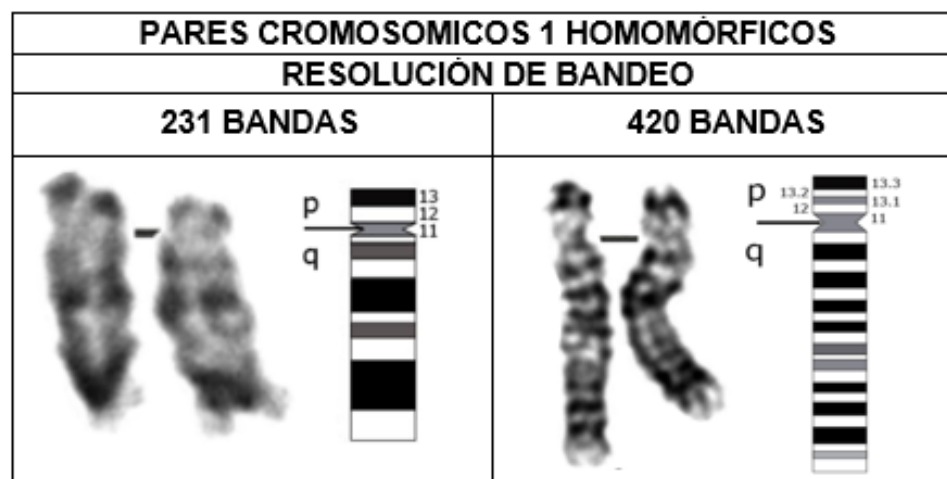


Figura 14: Secuencias de bandas G del cromosoma 1 de llama observadas a dos niveles de resolución (231 y 420) y sus Idiogramas. Se muestra la nomenclatura preliminar de bandas G de los brazos cortos.

En las llamas 1-A (macho procedente de Acopalca) y 1-H (hembra procedente de Huari) se observó que uno de los cromosomas homólogos presentaban la secuencia de 4 bandas, mientras que su homólogo, solo dos bandas. Este heteromorfismo es difícil de evidenciarlo en el patrón de bandeo a la resolución de 231 bandas (Figura 14); sin embargo es muy evidente la variación de longitud del brazo p entre los cromosomas homólogos (Figura 15).


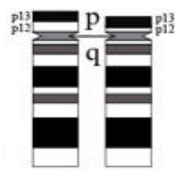
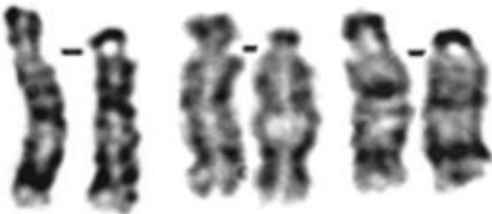

| | | PARES CROMOSÓMICOS 1 HETEROMÓRFICOS | IDIOGRAMA |
|---------------------------------|-----|--|---|
| NIVEL DE RESOLUCIÓN DE BANDAS G | 231 |  |  |
| | 420 |  |  |

Figura 15: Heteromorfismo en el brazo corto del cromosoma 1 de llama. Se presentan 5 pares cromosómico del cromosoma 1, de distintas metafases pertenecientes a 2 llamas y los Idiogramas a dos niveles de resolución, mostrando la nomenclatura preliminar de bandas G en los brazos cortos. El cromosoma con la variante 1p se encuentra ubicado a la derecha de cada par homólogo.

✓ CROMOSOMA 5

La secuencia de bandas G frecuente del brazo corto del cromosoma 5 inicia con una banda G- proximal al centrómero (1p12) y finaliza con una banda G+ terminal (1p13) (Figura 16).


| PARES CROMOSÓMICOS 5 HOMOMÓRFICOS | IDIOGRAMA |
|--|---|
|  |  |

Figura 16: Secuencia de bandas G del cromosoma 5 de llama y su Idiograma. Se muestra la nomenclatura preliminar de bandas G de su brazo corto.

En las llamas 2A y 3A (macho y hembra respectivamente) procedentes de la hacienda Acopalca, se observó que uno de los cromosomas homólogos presenta 2 bandas intersticiales adicionales a las que conforman la secuencia normal, notándose su brazo p más grande (Figura 17).

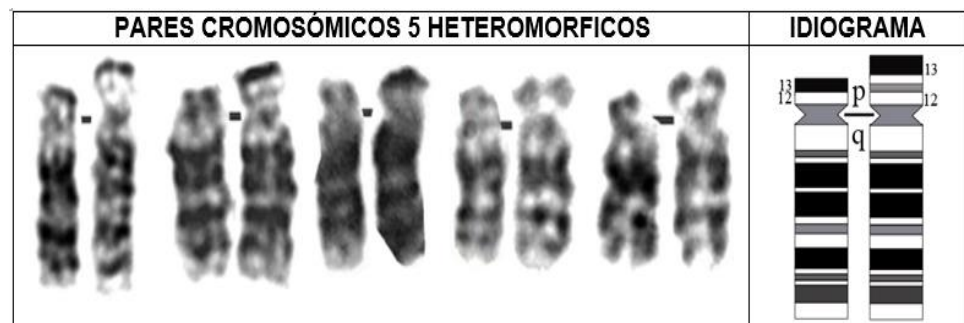


Figura 17: Heteromorfismo en el brazo corto del cromosoma 5 de llama. Se presentan 5 pares del cromosoma 5 de metafases distintas pertenecientes a 2 llamas y su idiograma, se muestra la nomenclatura preliminar de bandas G de los brazos cortos. El cromosoma con la variante 5p se encuentra ubicado a la derecha de cada par homólogo.

6. DISCUSIÓN

6.1. CARIOGRAMA POR COLORACIÓN CON GIEMSA

La gran cantidad de cromosomas subtelocéntricos y la no definición entre cromosomas submetacéntricos y metacéntricos que se observa en las investigaciones que se realizaron sin mediciones (Taylor *et al.*, 1968, Koulischer *et al.*, 1971, Bunch *et al.*, 1985, Balmus *et al.*, 2007) representaban una limitante para el análisis citogenético y demuestran la frágil consistencia de evaluar la morfología cromosómica de manera visual y la necesidad de emplear metodologías más objetivas, solucionándose al emplear el parámetro IC (Diberardino *et al.*, 2006; Ramos, 2014; Descailleaux, 2019), lo que demuestra su importancia para describir cromosomas no bandeados.

Los resultados de este estudio acerca de la morfología cromosómica se asemejan más con los de Ramos (2014), al coincidir la morfología de 34 de los 36 pares de cromosomas autosómicos, y Descailleaux (2018) al coincidir la morfología de 33 de los 36 pares de cromosomas autosómicos. Además, los 3 estudios concuerdan en la morfología metacéntrica de los cromosomas sexuales y del par cromosómico 35 en llamas. Con estas concordancias se demuestra que el empleo del parámetro métrico IC para determinar la morfología cromosómica de la especie llama es una metodología consistente.

La aplicación de los parámetros métricos IC y RCL en este estudio favoreció la elaboración del cariógrama modelo de la llama, por coloración con Giemsa debido a que facilita su ordenamiento decreciente por tamaño y permite el reconocimiento inicial y posterior identificación de los pares cromosómicos por su morfología, tomando como referencia la clasificación de los cromosomas

humanos, que ha permitido dividirlos en 7 grupos distinguibles del A al G, ISCN (2016).

La coloración con Giemsa facilita la observación morfológica de los cromosomas, y es de mucha utilidad por permitir una mejor medición, ya que al presentar una coloración uniforme, se aprecia con nitidez la posición del centrómero y la longitud de las cromátides. Adicionalmente se puede detectar anomalías numéricas y estructurales relativamente largas (Arsham *et al.*, 2017).

6.2. CARIOGRAMA OBTENIDO POR LA TÉCNICA GTG

La técnica GTG permitió en este estudio la identificación y caracterización longitudinal de cada par cromosómico de la llama a través de su patrón de bandas G, proporcionó como resultado el reporte del cariógrama modelo de bandas G y los Idiogramas 1 y 2. Esta técnica GTG también se ha aplicado en trabajos recientes y ha permitido la caracterización cromosómica en otros animales (Raudsepp y Chowdhary, 2016; Verano *et al.*, 2016).

En los trabajos de Di Berardino *et al.* (2006), Balmus *et al.* (2007) y Ávila *et al.* (2012) quienes aplicaron la técnica para obtener bandas G, existió un inconveniente al comparar los idiogramas, debido a que a pesar que se observó coincidencias en las secuencias de los pares cromosómicos autosómicos, con algunas pequeñas variaciones en bandas, debido a la diferencia de nivel de resolución, la posición en sus cariógramas por longitud decreciente de algunos pares cromosómicos no coincidía, especialmente en los pares cromosómicos del 26 al 33. Una manera de solucionar esta dificultad sería realizar el análisis con coloración con Giemsa y luego con bandeo cromosómico en la misma metafase.

La no coincidencia en el ordenamiento de algunos pares cromosómicos de camélidos en los idiogramas de bandas G reportados en 4 trabajos (Di Berardino *et al.*, 2006; Balmus *et al.*, 2007; Ávila *et al.*, 2012; Ramos, 2014), de los cuales dos de ellos (Di Berardino *et al.*, 2006; Ramos, 2014) más el presente estudio, emplearon el parámetro de RCL, demuestra la dificultad de ordenar los cromosomas por tamaño debido a la gran cantidad de cromosomas con longitudes y morfología similares. Es así que se sugiere emplear una metodología complementaria al parámetro métrico RCL para estandarizar el cariograma de la llama o ejecutar el análisis citogenético por clasificación de los cromosomas según su morfología como lo realiza Di Berardino *et al.* (2006).

En el caso del cromosoma sexual X, su identificación fue instantánea gracias, en primer lugar, a su morfología y luego a la similitud de bandas con el cromosoma X de humanos. Cabe resaltar que el patrón de bandas G coincide con los ideogramas reportados por Di Berardino *et al.* (2006); Balmus *et al.* (2007) y Ramos (2014).

En el caso del cromosoma Y, se logró diferenciar en primera instancia debido a que el bandeo de su brazo p es diferente al de los pares 35 y 36 a pesar de ser los metacéntricos de menor longitud, consiste en una banda G+ en estos dos cromosomas autosómicos y en cambio, una banda G- en el cromosoma Y. Posteriormente, se observó que el patrón de bandeo coincidía con el reportado por los demás autores (Di Berardino *et al.* 2006; Balmus *et al.* 2007) en su morfología y patrón de bandas R obtenido por Ramos, 2014, obviamente notando patrones opuestos esperados entre las bandas G y R.

Adicionalmente, el empleo de sondas específicas para los cromosomas sexuales X e Y en el trabajo de Di Berardino *et al.* (2006) y la semejanza de sus resultados del bandeo cromosómico con los obtenidos en este estudio, dan un respaldo a la identificación del cromosoma Y en el presente trabajo.

6.3. NIVEL DE RESOLUCIÓN DE BANDAS G

De todas las investigaciones reportadas hasta la fecha sobre bandeos cromosómicos de diferenciación longitudinal en cromosomas de camélidos, solamente Di Berardino *et al.* (2006) informa el nivel de bandeo visualizado, el cual es de 391 bandas con la técnica RBG en cromosoma prometafásicos de alpaca. Debido a la existencia de los idiogramas en las publicaciones de los trabajos de Balmus *et al.* (2007), Avila *et al.* (2012), Ramos (2014), con la finalidad de estimar en qué nivel de resolución los autores trabajaron, se realizó un conteo de las bandas y se determinó un rango entre 306 a 326 bandas (G o R) en cromosomas de dromedario, alpaca y llama (Balmus *et al.*, 2007; Avila *et al.*, 2012; Ramos, 2014).

En este estudio, el nivel de resolución de 420 bandas G obtenido es superior al nivel de resolución de Di Berardino *et al.* (2006) que considera cromosomas prometafásicos con una resolución de 391 bandas R, por lo tanto, se refuerza la denominación de cromosomas prometafásicos (en este estudio) a los cromosomas de llamas que presentan el mayor nivel de resolución de bandas G (420 bandas) a pesar de que Huret *et al.* (1987) propone la denominación de cromosomas prometafasicos de humanos a partir de 700 bandas.

6.4. VARIABLES DEL BRAZO CORTO DE LOS CROMOSOMAS 1 Y 5

La importancia clínica de poder estandarizar la nomenclatura internacional de una especie animal mediante las técnicas de bandeo cromosómico radica en poder detectar alguna variación cromosómica para un correcto análisis citogenético.

A pesar de los múltiples estudios citogenéticos realizados a los camélidos, no se ha logrado obtener un cariograma estándar, lo cual no facilita la identificación de estas variantes cromosómicas. Existe dos reportes de variaciones en la secuencia de bandas G y R en el brazo corto del cromosoma 1 de camélidos: Marin *et al.* (2007) demostraron una diferencia interespecífica en el patrón de bandeo G entre los CSA silvestres y domésticos y Descailleaux (2018) reportó heteromorfismo en alpacas, al encontrar dos secuencias de bandas diferentes de bandeo G y R en el brazo p del cromosoma 1.

Por lo tanto, este trabajo resalta por ser la primera vez que se reporta variantes cromosómicas intraespecíficas en la especie *Lama glama*.

Al comparar estos reportes, mencionados líneas arriba, con las secuencias obtenidas en esta investigación, se observa que la secuencia descrita en este estudio con la resolución de 231 bandas coincide con la manifestada por Marin *et al.* (2007) y la secuencia del cromosoma 1 de tipo 1b reportada por Descailleaux (2018) en llamas (Figura 4), no obstante, la secuencia del cromosoma 1 tipo 1a de Descailleaux (2018) no coincide con la secuencia obtenida a la resolución de 420 bandas en este estudio, lo cual podría deberse

a las diferentes resoluciones de bandeo o a la posible existencia de otras variantes 1p para la especie llama.

La génesis de la variante 1p podría deberse a una delección intersticial de las bandas 1p12 y 1p13.1 sustentado por la coloración y tamaño de las dos bandas observadas en los brazos cortos de los cromosomas heteromórficos: una banda G+ terminal intensamente coloreada concordante con la banda 1p13.3 y la banda G- proximal al centrómero poco visible que corresponde con la banda 1p13.2 (Figura 15). El origen de las bandas adicionales detectadas en el brazo corto de los cromosomas 5 heteromórficos es difícil de determinar por citogenética, pero gracias a la banda G+ terminal la cual se observa con una coloración más intensa y gruesa que la banda frecuente 5p13 hace suponer un posible evento de duplicación, razón por la cual se indicó en el Idiograma de la Figura 17 como si fuera la misma banda, sin embargo, también podría deberse a una adición de material genético desconocido, por consiguiente se sugiere un análisis por técnicas moleculares para así conseguir mayor conocimiento.

Las llamas empleadas en este estudio eran aparentemente sanas, seleccionadas por el veterinario a cargo, por lo que se podría suponer que las variantes 1p y 5p no son perjudiciales para su salud. Esta idea refuerza la hipótesis de su génesis por eventos de duplicaciones y delecciones que son comunes y normales en el genoma y generan lo que se conoce como variantes Eucromáticas (Jalal ,2004) así como también podría deberse a variaciones de heterocromatina centromérica o pericentromérica (Descailleaux, 2018). No obstante, es necesario realizar evaluaciones médicas más rigurosas para confirmar o descartar este planteamiento.

El hecho que solamente se conozca variaciones en el brazo corto del cromosoma 1 es debido a que es el cromosoma con mayor longitud en el cariotipo de la llama, lo que permite una mejor visualización de las bandas. Sin embargo en este trabajo se muestran variantes en el brazo corto del cromosoma 5, sin reporte previo en la literatura, lo que indica que posiblemente existan más variaciones en el cariograma de los camélidos, que no pueden haber sido notados principalmente por la alta complejidad de su cariotipo junto con otros factores como la mala calidad de las metafases e imagen fotográfica, mal bandeo cromosómico y bajo nivel de resolución.

Al observar el aspecto evolutivo cabe mencionar que debido al reporte de Marin *et al.* (2007) en referencia a la semejanza del patrón de bandas G del cromosoma 1 entre llamas y guanacos, se sugiere evaluar la presencia de los 2 heteromorfismos mostrados en este trabajo en las demás especie de CSA. De tal manera que si resulta afirmativo para guanaco y negativo para alpaca y vicuña, sería un mayor soporte a la teoría de origen de la llama por la domesticación del guanaco. Sin embargo, hay que tener presente el gran porcentaje de alpacas híbridas reportadas por Kadwell *et al.* (2001) y Wheeler (2005), porque los entrecruzamientos de CSA y la generación de crías fértiles podrían ser la razón de la dispersión de variantes cromosómicas entre los camélidos del nuevo mundo.

7. CONCLUSIONES

- Se logró determinar el patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas prometafásicos de la llama mediante la técnica GTG.
- Se confeccionó dos idiogramas de los cromosomas de la llama, a una resolución de 420 y 231 bandas.
- El parámetro métrico IC es una herramienta útil para definir la morfología de los cromosomas de la llama.
- El empleo del parámetro métrico RCL es auxiliar para el ordenamiento de todos los cromosomas en el cariograma de la llama.
- El cultivo celular por incorporación de 5-BrdU permite obtener cromosomas prometafásicos de llamas con morfología definida que facilita el análisis citogenético con la técnica GTG.
- Los cromosomas 1 y 5 de llama presentan variantes en las secuencias de bandas G de sus brazos cortos.

8. RECOMENDACIONES

- Probar protocolos de sincronización celular y otros químicos anticoncentración cromosómica que permitan obtener cromosomas prometafásicos y/o profásicos con la finalidad de facilitar el análisis cromosómico, así poder detectar con mayor precisión otros posibles heteromorfismos y estandarizar la nomenclatura de las bandas.
- Debido a la complejidad del cariotipo de la llama y la dificultad de obtener cromosomas con mayor elongación, se recomienda realizar pruebas moleculares que confirmen los heteromorfismos reportados, para después evaluar su implicancia clínica.
- Analizar una mayor cantidad de individuos llamas y de diferentes regiones peruanas para corroborar los resultados obtenidos en este estudio.
- Implementar el software Cytovision con una plantilla para su empleo en la confección de los cariogramas de llamas, facilitando su observación y acelerando el análisis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameghino, E. & DeMartini, J. (1991). Mortalidad en crías de alpaca. Perú: IVITA-UNMSM, p 128.
- Arsham, M. S., Barch, M. J., & Lawce, H. J. (Eds.). (2017). The AGT cytogenetics laboratory manual. John Wiley & Sons.
- Ávila, F., Das, P., Kutzler, M., Owens, E., Perelman, P., Rubes, J., Hornak, M., Jhonson, W., & Raudsepp, T. (2012). Development and application of camelian molecular cytogenetics tools. J Hered: 1 – 12. Doi: 10.1093/jhered/ess067.
- Balmus, G., Trifonov, V., Biltueva, L., O'Brien, P., Alkalaeva, E., Fu, B., Skidmore, J., Allen, T., Graphodatsky, A., Yang, F., & Ferguson-Smith, M. (2007). Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. Chromosome research 15: 499-514.
- Bianchi, N., Larramendy, M., Bianchi, M., & Cortés, L. (1985). Karyological conservatism in South American camelids. Experientia 42: 622-623. Birkhäuser Verlag, CH – 4010 Basel / Switzerland.
- Bunch, T.D., Foote, W.C., & Mc Aciulis, A. (1985). Chromosome banding pattern homologies and NORs for the Bactrian camel, guanaco and llama. J Hered 76:115-118. Calle Escobar, R. Producción y mejoramiento de la alpaca.
- Calle, R. (1982). Producción y mejoramiento de la alpaca.
- Capanna, E. & Civitelli, M.V. (1965). The chromosomes of three species of neotropical Camelidae, Mamm Chrom Newsl. 17:75-79.
- Cardich, A. (1985). "Origen del hombre y de la cultura andina". En: Historia del Perú. Sexta edición. Lima, Juan Mejía Baca editor. 1:31-156.
- CONACS. (2005). La llama (*Lama glama*). Sitio Argentino de Producción Animal. Lima, Perú.
- Descailleaux, R. J. (2018). "Los cariotipos de las llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) de Junín y Huancavelica muestran al menos dos mutaciones estructurales". (Tesis de Doctorado). Universidad Mayor de San Marcos. Perú.
- Di Berardino, D., Nicodemo, D., Coppola, G., King, A.W., Ramunno, L., Cosenza, G.F., Iannuzzi, L., Di Meo, G.P., Balmus, G., & Rubes, J. (2006). Cytogenetic characterization of alpaca (*Lama pacos*, fam. Camelidae) prometaphase chromosomes. Cytogenetic genome Res 115: 138 – 144.
- Fernández, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

- Fowler, M. E. (1998). *Medicine and surgery of South American Camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco* (No. Ed. 2). Iowa State University Press.
- Fowler, M. E. (2008). Camelids are not ruminants. En *Zoo and wild Animal Medicine*. Saunders. St. Louis. Missouri.
- Franklin, W.L. & Powell, K.J. (1994). Guard llamas: a part of integrated sheep protection. Iowa State University. University Extension. Ames, IA, USA.
- Gispert, C. (1984). Auquénidos, producción ganadera. En: *Biblioteca práctica agrícola y ganadera*. España, Editorial Océano, 4:93.
- Harrison, J.A. (1985). Giant camels from the Cenozoic of North America. *Smithsonian Contributions to Paleobiology*. 5-7: 1-29.
- Huanca, T. (1993). *Manual del alpaquero*. Lima – Peru, INIA.
- Hsu, T.C., & Benirschke, K. (1967). *An atlas of mammalian chromosomes Vol I*. Folio 40, Springer-Verlag, New York.
- Hungerford, D.A., & Snyder, R. (1966). Chromosomes of European wolf (*Canis lupus*) and of a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Mamm Chrom Newsl* 20: 72.
- Hurrett, J.L., Leonard, C., & Aurias, A. (1987). Proposal for scoring the quality of the banding of chromosome. *Hum Genet*; 75:373-377.
- Iñiguez, L.C., & Alem, R. (1996). Role of camelids as means of transportation and Exchange in the Andean region of Bolivia. *Word Animal Review* 86: 12-21.
- ISCN (2016): *An International System For Human Cytogenomic Nomenclature*. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds). Basel: S Karger, 2016.
- Jalal, S.M., & Ketterling. Euchromatic Variants. (2004). In: Wyandt HE, Tonk VS (eds) *Atlas of human chromosome heteromorphisms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 75-95.
- Kadwell, M., Fernández, M., Stanley, H., Baldi, R., Wheeler, J.C., Rosadio, R., & Bruford, M.W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2575-2584.
- Koulischer, L., Tijssens, J., & Mortelmans, J. (1971). Mammalian cytogenetics IV: The chromosomes of two male Camelidae: *Camelus bactrianus* and *Lama vicugna*. *Acta Zool Pathol Antverpiensia* 52: 89-92.
- Leguía, G. (1995). *Enfermedades parasitarias y Atlas parasitológico de camélidos sudamericanos*. Lima, Editorial De Mar: 5.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.

- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classis, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tenth ed. Vol. 1. Laurentii Salvii, Stockholm, 824 pp.
- Marín, J., Zapata, B., González, B., Bonacic, C., Wheeler, J., Casey, C., Bruford, M., Palma, E., Poulin, E., Alliende, A., & Spotorno, A. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular; *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.
- Mason, I.L. (1984). *Evolution of domesticated animals*. Longman, London, 252 pp.
- Matos, M., & Rabines, R. (1985). "El periodo arcaico". En: *Historia del Perú*. Sexta edición. Lima, Juan Mejía Baca editor; 1:196-197.
- Mendoza, M. N., Raudsepp, T., Alshanbari, F., Gutierrez Reynoso, G. A., & Ponce de León, F. A. (2019). Chromosomal localization of candidate genes for fiber growth and color in alpaca (*Vicugna pacos*). *Frontiers in genetics*, 10, 583.
- Molina, J.I. (1782). *Saggio sale storia. Naturale del Chile*. Bologna.
- Muller, P.L.S. (1776). *Natursystem*. Supplements and register-band, numberg.
- ONU. (2010). *El futuro de los productos andinos en la región alta de los Valles centrales de Los Andes/ Textiles-Camélidos*. Estado de situación del sector textil camélidos en el Perú. (Diagnostico Nacional). TF-AND-TEX-006. V3.01.05.10.
- Pinto, C., Martín, C., & Cid, M. (2010). Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4 (1): 23 – 36.
- Ramos, M. (2014). "Descripción del patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas de alpacas y llamas". (Tesis de Maestria). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Raudsepp, T., & Chowdhary, B. P. (2016). Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. *Annual review of animal biosciences*, 4, 15-43.
- Reyna, J. (2005). *The Origin and Evolution of the South American Camelids*.
- Rostworowski, M. (1988). Los recursos renovables del Tahuantinsuyo, la ganadería. En: *Historia del Tahuantinsuyo*. Tercera edición. Lima, IEP, 251-257.
- Skidmore, J.A., Billah, M., Binns, M., Short, R.V., & Allen, W.R. (1999). Hybridizing Old and New World camelids: *Camelus dromedaries* x *Lama guanicoe*. *Proc Biol Sci* 266: 649-656.
- Stanley, H.F., Kadwell, M., & Wheeler, J.C. (1994). Molecular evolution of the Camelidae: a mitochondrial study. *Proc R. Soc. Lond B* 256: 1 – 6.
- Stemmer, A., Wurzinger, M., Soelkner, J., Zárate, A. V., Nuernberg, M., & Delgado, J. (2005). La llama de Ayopaya: descripción de un recurso genético autóctono. *Archivos de Zootecnia* 54: 253-359.

- Taylor, K.M., Hungerford, D.A., Synder, R.C., & Ulmer, F. (1968). Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetics* 7: 8.
- UNEPCA (Unidad Ejecutora del Proyecto Camélidos). (1997). Estudio de base sobre la situación de la producción de camélidos en Bolivia. UNEPCA, FDC, FIDA, CAF, IICA. La Paz, Bolivia.
- Verano, M., Moya, J., & Vega, R. (2016). Análisis citogenético en *Canis lupus familiaris* con neoplasias Cytogenetic analysis in *Canis lupus familiaris* with neoplasm. *Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular*, 6.
- Webb, S.D. (1974). Locomotor evolution in camels. *Forma Functio* 5: 99 – 112.
- Wheeler, J. C. (1991). Origen, evolución y status actual. En: Fernández-Baca, S. (ed). *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. FAO. Santiago, Chile. 429 pp.
- Wheeler, J. C. (1995). Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54(3), 271-295.
- Wheeler, J. C., A. J. F. Russel y H. Redden. (1995). Llamas and Alpacas: Pre-Conquest Breeds and Post-Conquest Hybrids, *Journal of Archaeological Science* 22 (6), 833-840, New York.
- Wheeler J.C. (2005). Camelid Research in Peru. *International Camelid Quarterly* 4(2): 7-10.

10. ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A) Siembra

- **Solución Puck**

Pesar 8 g de NaCl, 0.4 de KCl y 0.35 g NaHCO₃ y disolverlos en 1 litro de agua bidestilada estéril. Luego ajustar el pH a 7 con HCL 1N y refrigerar hasta su uso.

- **Concanavalina A**

Pesar 0.01 g de Concanavalina A y disolver en 10 ml de solución Puck, alicuotar y congelar.

- **Colchicina**

Diluir una pastilla de colchicina 0.5 mg en 500 ml de agua destilada.

- **5-BrdU**

Pesar 0.01 g de 5-BrdU y disolver en 10 ml de solución Puck, alicuotar y congelar.

B) Preparación Citológica

- **KCl (0.075M)**

Pesar 0.56 g de cloruro de potasio (KCl) y diluir en 100 ml de agua destilada, homogenizar y dejar en baño maria a 37°C hasta su empleo.

- **Fijador Carnoy**

Preparar la cantidad exacta a emplearse en cada paso 15 minutos antes en una proporción de 3 de etanol y 1 de ácido acético, homogenizar y mantenerlo a -20°C.

C) Tripsina

- **Solución madre de tripsina al 1%**

Pesar 5 g de tripsina y diluir en 500 ml de agua bidestilada, filtrar 15 veces, alicuotar viales de 5 ml y congelar.

- **Preparación de Solución G**

Pesar 3,4g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y diluir en 1L de agua destilada. Homogenizar y medir el pH el cual debe estar entre 6.8 a 7.0.

- **Solución de trabajo de tripsina:**

Combinar 5 ml de solución madre de tripsina al 1%, previamente descongelada, con 22.5 ml de Solución G y 22.5 ml de suero fisiológico.

D) Giemsa

- **Solución madre:**

Disolver, de a pocos y sin dejar grumos, 4 g de Giemsa en 264 ml de Glicerol precalentado a 60°C en Baño.

Después añadir 264 ml de metanol, homogenizar, filtrar, guardar en frasco ámbar y dejar almacenado a temperatura ambiente por 2 semanas antes su uso.

- **Soluciones fosfato:**

Solución A: disolver 8.1654 g de KH_2PO_4 0.06M en un litro de agua destilada y mantener refrigerado.

Solución B: disolver 16.0848 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 M en un litro de agua destilada y mantener refrigerado.

- **Solución de trabajo:**

Añadir en un couplin 3 ml de solución madre de Giemsa, 5 ml de Solución A, 5 ml de Solución B y 47 ml de agua destilada.

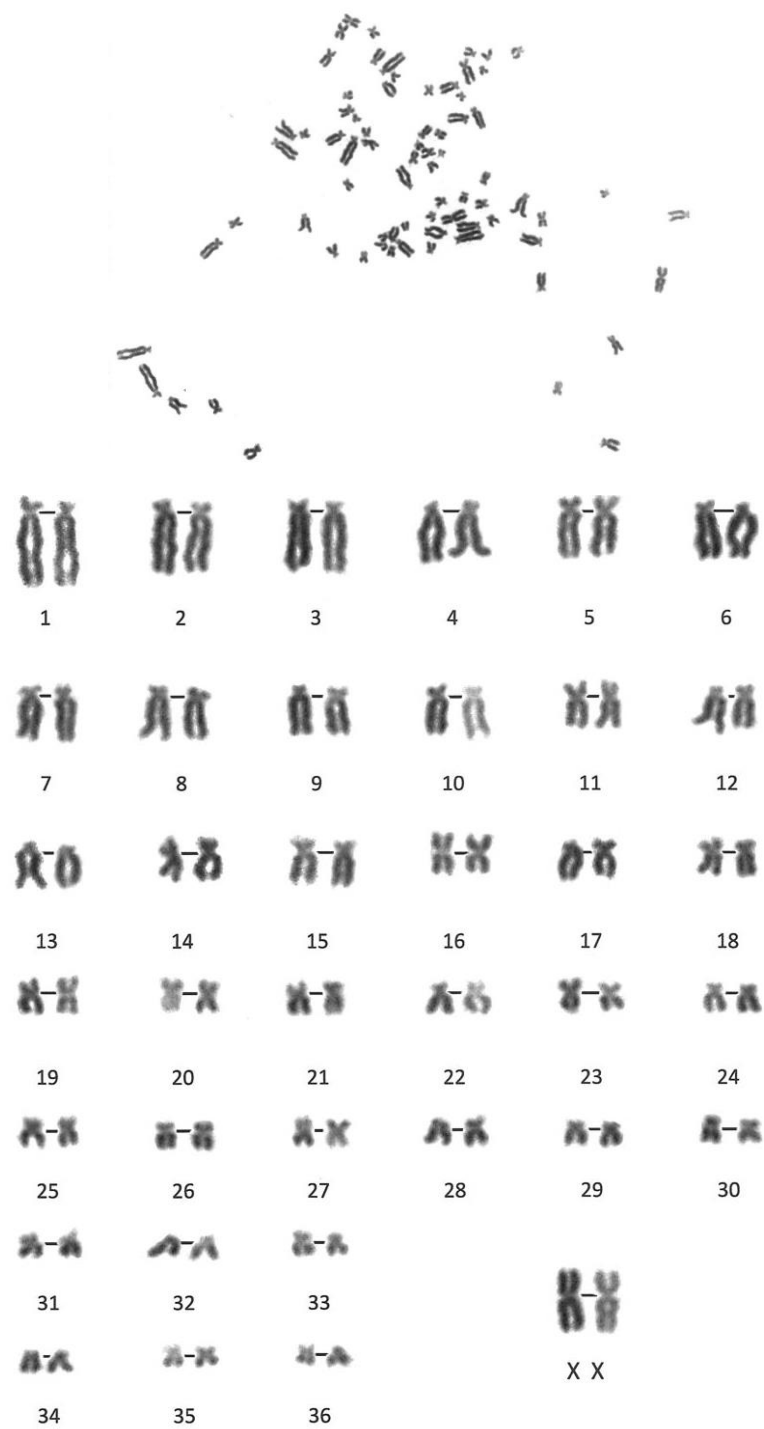
Tabla 4: Tabla de medidas cromosómicas de una metafase coloreada con Giemsa de la llama ♂ 11-A. Se muestra además los índices RCL e IC y la clasificación por morfología.

| PAR CROMOSOMICO | LONG BRAZOS | LLAMA ♂ 11-A | | | | | | | RCL | IC | CLASIFICACIÓN |
|-----------------|-------------|--------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|------------------------|------|------|---------------|
| | | HOMÓLOGO 1 | | MEDIA | HOMÓLOGO 2 | | MEDIA | PROMEDIO POR CROMOSOMA | | | |
| | | CROMÁTIDE 1 | CROMÁTIDE 2 | | CROMÁTIDE 1 | CROMÁTIDE 2 | | | | | |
| 1 | p | 15.75 | 15.48 | 15.62 | 15.90 | 18.21 | 17.05 | 16.33 | 5.73 | 0.18 | st |
| | q | 76.81 | 76.63 | 76.72 | 79.86 | 72.17 | 76.02 | 76.37 | | | |
| | p+q | 92.57 | 92.11 | 92.34 | 95.76 | 90.37 | 93.07 | 92.70 | | | |
| 2 | p | 18.39 | 14.43 | 16.41 | 18.15 | 16.03 | 17.09 | 16.75 | 5.27 | 0.20 | st |
| | q | 71.99 | 72.16 | 72.08 | 67.83 | 62.02 | 64.92 | 68.50 | | | |
| | p+q | 90.39 | 86.59 | 88.49 | 85.98 | 78.05 | 82.01 | 85.25 | | | |
| 3 | p | 17.87 | 9.66 | 13.77 | 13.96 | 13.44 | 13.70 | 13.73 | 5.01 | 0.17 | st |
| | q | 68.02 | 71.57 | 69.79 | 65.88 | 64.04 | 64.96 | 67.38 | | | |
| | p+q | 85.89 | 81.23 | 83.56 | 79.84 | 77.48 | 78.66 | 81.11 | | | |
| 4 | p | 13.62 | 14.67 | 14.15 | 14.72 | 14.47 | 14.59 | 14.37 | 4.16 | 0.21 | st |
| | q | 49.66 | 53.83 | 51.74 | 52.71 | 55.75 | 54.23 | 52.99 | | | |
| | p+q | 63.28 | 68.50 | 65.89 | 67.43 | 70.22 | 68.82 | 67.36 | | | |
| 5 | p | 12.39 | 8.10 | 10.24 | 5.54 | 6.52 | 6.03 | 8.14 | 3.89 | 0.13 | st |
| | q | 52.25 | 50.89 | 51.57 | 54.29 | 62.02 | 58.16 | 54.86 | | | |
| | p+q | 64.64 | 58.98 | 61.81 | 59.83 | 68.53 | 64.18 | 63.00 | | | |
| 6 | p | 11.28 | 16.43 | 13.85 | 11.28 | 13.07 | 12.17 | 13.01 | 3.73 | 0.22 | st |
| | q | 42.00 | 48.13 | 45.06 | 50.23 | 49.23 | 49.73 | 47.40 | | | |
| | p+q | 53.27 | 64.56 | 58.92 | 61.51 | 62.30 | 61.90 | 60.41 | | | |
| 7 | p | 13.21 | 13.89 | 13.55 | 10.56 | 14.10 | 12.33 | 12.94 | 3.50 | 0.23 | st |
| | q | 42.39 | 44.06 | 43.23 | 44.65 | 43.47 | 44.06 | 43.64 | | | |
| | p+q | 55.61 | 57.96 | 56.78 | 55.21 | 57.57 | 56.39 | 56.58 | | | |
| 8 | p | 13.83 | 14.24 | 14.03 | 11.37 | 12.95 | 12.16 | 13.10 | 3.46 | 0.23 | st |
| | q | 36.51 | 42.43 | 39.47 | 47.38 | 45.50 | 46.44 | 42.95 | | | |
| | p+q | 50.34 | 56.67 | 53.50 | 58.75 | 58.45 | 58.60 | 56.05 | | | |
| 9 | p | 11.61 | 13.16 | 12.38 | 11.44 | 17.21 | 14.33 | 13.35 | 3.41 | 0.24 | st |
| | q | 43.15 | 40.70 | 41.92 | 46.69 | 36.47 | 41.58 | 41.75 | | | |
| | p+q | 54.75 | 53.86 | 54.31 | 58.12 | 53.68 | 55.90 | 55.11 | | | |
| 10 | p | 4.37 | 7.24 | 5.81 | 11.23 | 10.56 | 10.89 | 8.35 | 3.10 | 0.17 | st |
| | q | 42.86 | 44.00 | 43.43 | 42.89 | 37.39 | 40.14 | 41.79 | | | |
| | p+q | 47.23 | 51.24 | 49.24 | 54.12 | 47.94 | 51.03 | 50.14 | | | |
| 11 | p | 16.99 | 13.05 | 15.02 | 16.47 | 16.49 | 16.48 | 15.75 | 3.25 | 0.30 | sm |
| | q | 40.04 | 39.34 | 39.69 | 37.15 | 30.85 | 34.00 | 36.85 | | | |
| | p+q | 57.03 | 52.40 | 54.71 | 53.62 | 47.34 | 50.48 | 52.60 | | | |
| 12 | p | 6.73 | 5.07 | 5.90 | 9.44 | 9.41 | 9.43 | 7.66 | 2.99 | 0.16 | st |
| | q | 37.59 | 40.16 | 38.87 | 41.86 | 43.33 | 42.60 | 40.73 | | | |
| | p+q | 44.32 | 45.23 | 44.77 | 51.30 | 52.74 | 52.02 | 48.40 | | | |
| 13 | p | 10.89 | 10.27 | 10.58 | 7.82 | 10.51 | 9.16 | 9.87 | 2.90 | 0.21 | st |
| | q | 33.09 | 38.09 | 35.59 | 38.72 | 38.43 | 38.58 | 37.08 | | | |
| | p+q | 43.98 | 48.36 | 46.17 | 46.54 | 48.94 | 47.74 | 46.95 | | | |
| 14 | p | 23.53 | 16.49 | 20.01 | 20.96 | 20.93 | 20.95 | 20.48 | 2.81 | 0.45 | m |
| | q | 23.61 | 25.31 | 24.46 | 24.91 | 26.00 | 25.46 | 24.96 | | | |
| | p+q | 47.15 | 41.80 | 44.47 | 45.87 | 46.93 | 46.40 | 45.44 | | | |
| 15 | p | 18.36 | 19.59 | 18.97 | 12.46 | 9.06 | 10.76 | 14.87 | 2.76 | 0.33 | sm |
| | q | 28.82 | 26.93 | 27.87 | 28.43 | 34.80 | 31.61 | 29.74 | | | |
| | p+q | 47.18 | 46.51 | 46.85 | 40.88 | 43.86 | 42.37 | 44.61 | | | |
| 16 | p | 21.06 | 20.39 | 20.73 | 19.63 | 20.64 | 20.14 | 20.43 | 2.70 | 0.47 | m |
| | q | 22.86 | 22.30 | 22.58 | 23.42 | 24.46 | 23.94 | 23.26 | | | |
| | p+q | 43.93 | 42.69 | 43.31 | 43.05 | 45.10 | 44.08 | 43.69 | | | |
| 17 | p | 16.82 | 20.12 | 18.47 | 18.47 | 15.27 | 16.87 | 17.67 | 2.69 | 0.41 | m |
| | q | 24.19 | 27.31 | 25.75 | 26.52 | 25.41 | 25.96 | 25.86 | | | |
| | p+q | 41.01 | 47.42 | 44.22 | 44.99 | 40.69 | 42.84 | 43.53 | | | |
| 18 | p | 14.35 | 12.00 | 13.17 | 8.70 | 9.78 | 9.24 | 11.21 | 2.50 | 0.28 | sm |
| | q | 29.70 | 30.67 | 30.18 | 27.98 | 28.70 | 28.34 | 29.26 | | | |
| | p+q | 44.04 | 42.67 | 43.35 | 36.68 | 38.49 | 37.58 | 40.47 | | | |
| 19 | p | 15.61 | 15.88 | 15.74 | 15.62 | 17.62 | 16.62 | 16.18 | 2.21 | 0.45 | m |
| | q | 24.03 | 17.44 | 20.73 | 17.16 | 19.97 | 18.56 | 19.65 | | | |
| | p+q | 39.63 | 33.31 | 36.47 | 32.78 | 37.58 | 35.18 | 35.83 | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|----|
| 20 | p | 14.50 | 11.08 | 12.79 | 13.98 | 12.54 | 13.26 | 13.02 | 2.12 | 0.38 | m |
| | q | 20.91 | 21.67 | 21.29 | 21.63 | 20.73 | 21.18 | 21.24 | | | |
| | p+q | 35.41 | 32.74 | 34.08 | 35.61 | 33.27 | 34.44 | 34.26 | | | |
| 21 | p | 12.53 | 11.72 | 12.12 | 11.28 | 10.65 | 10.96 | 11.54 | 2.08 | 0.34 | sm |
| | q | 25.59 | 21.12 | 23.36 | 20.12 | 21.44 | 20.78 | 22.07 | | | |
| | p+q | 38.12 | 32.84 | 35.48 | 31.39 | 32.10 | 31.74 | 33.61 | | | |
| 22 | p | 14.74 | 10.86 | 12.80 | 9.52 | 9.06 | 9.29 | 11.05 | 2.05 | 0.33 | sm |
| | q | 18.72 | 18.61 | 18.66 | 24.12 | 26.98 | 25.55 | 22.11 | | | |
| | p+q | 33.46 | 29.47 | 31.46 | 33.64 | 36.04 | 34.84 | 33.15 | | | |
| 23 | p | 11.90 | 13.85 | 12.88 | 10.65 | 11.23 | 10.94 | 11.91 | 2.03 | 0.36 | sm |
| | q | 18.65 | 24.36 | 21.50 | 19.72 | 21.03 | 20.38 | 20.94 | | | |
| | p+q | 30.55 | 38.21 | 34.38 | 30.38 | 32.26 | 31.32 | 32.85 | | | |
| 24 | p | 10.37 | 9.06 | 9.71 | 8.69 | 10.16 | 9.43 | 9.57 | 1.86 | 0.32 | sm |
| | q | 20.81 | 20.90 | 20.86 | 21.18 | 19.50 | 20.34 | 20.60 | | | |
| | p+q | 31.18 | 29.96 | 30.57 | 29.87 | 29.66 | 29.77 | 30.17 | | | |
| 25 | p | 10.16 | 11.81 | 10.99 | 13.91 | 12.84 | 13.38 | 12.18 | 1.86 | 0.41 | m |
| | q | 19.14 | 16.55 | 17.85 | 16.95 | 18.90 | 17.92 | 17.89 | | | |
| | p+q | 29.30 | 28.36 | 28.83 | 30.86 | 31.74 | 31.30 | 30.07 | | | |
| 26 | p | 9.66 | 6.68 | 8.17 | 6.25 | 8.00 | 7.12 | 7.65 | 1.83 | 0.26 | sm |
| | q | 21.25 | 20.55 | 20.90 | 19.70 | 26.57 | 23.14 | 22.02 | | | |
| | p+q | 30.92 | 27.23 | 29.07 | 25.95 | 34.57 | 30.26 | 29.67 | | | |
| 27 | p | 5.12 | 5.84 | 5.48 | 11.28 | 9.22 | 10.25 | 7.86 | 1.73 | 0.28 | sm |
| | q | 20.07 | 22.47 | 21.27 | 16.95 | 21.01 | 18.98 | 20.13 | | | |
| | p+q | 25.19 | 28.31 | 26.75 | 28.23 | 30.22 | 29.23 | 27.99 | | | |
| 28 | p | 10.97 | 13.33 | 12.15 | 12.03 | 9.66 | 10.85 | 11.50 | 1.68 | 0.42 | m |
| | q | 16.90 | 14.50 | 15.70 | 15.85 | 15.50 | 15.67 | 15.69 | | | |
| | p+q | 27.87 | 27.83 | 27.85 | 27.88 | 25.16 | 26.52 | 27.18 | | | |
| 29 | p | 5.97 | 3.69 | 4.83 | 5.51 | 4.83 | 5.17 | 5.00 | 1.68 | 0.18 | st |
| | q | 21.19 | 20.41 | 20.80 | 21.50 | 25.71 | 23.61 | 22.20 | | | |
| | p+q | 27.16 | 24.11 | 25.63 | 27.01 | 30.54 | 28.78 | 27.20 | | | |
| 30 | p | 8.50 | 8.65 | 8.58 | 13.11 | 12.52 | 12.82 | 10.70 | 1.54 | 0.43 | m |
| | q | 14.64 | 15.14 | 14.89 | 14.20 | 13.12 | 13.66 | 14.28 | | | |
| | p+q | 23.15 | 23.79 | 23.47 | 27.31 | 25.64 | 26.48 | 24.97 | | | |
| 31 | p | 8.58 | 9.41 | 9.00 | 8.52 | 8.00 | 8.26 | 8.63 | 1.43 | 0.37 | m |
| | q | 14.93 | 14.63 | 14.78 | 14.64 | 13.52 | 14.08 | 14.43 | | | |
| | p+q | 23.51 | 24.05 | 23.78 | 23.16 | 21.51 | 22.34 | 23.06 | | | |
| 32 | p | 6.68 | 7.33 | 7.00 | 6.87 | 6.42 | 6.64 | 6.82 | 1.37 | 0.31 | sm |
| | q | 14.64 | 15.02 | 14.83 | 15.06 | 16.60 | 15.83 | 15.33 | | | |
| | p+q | 21.32 | 22.36 | 21.84 | 21.93 | 23.02 | 22.47 | 22.16 | | | |
| 33 | p | 4.72 | 6.96 | 5.84 | 5.63 | 5.97 | 5.80 | 5.82 | 1.32 | 0.27 | sm |
| | q | 16.36 | 14.35 | 15.35 | 17.17 | 14.35 | 15.76 | 15.56 | | | |
| | p+q | 21.08 | 21.31 | 21.19 | 22.80 | 20.32 | 21.56 | 21.38 | | | |
| 34 | p | 3.69 | 4.58 | 4.14 | 4.34 | 3.43 | 3.89 | 4.01 | 1.24 | 0.20 | st |
| | q | 17.39 | 14.43 | 15.91 | 16.17 | 16.09 | 16.13 | 16.02 | | | |
| | p+q | 21.09 | 19.01 | 20.05 | 20.51 | 19.53 | 20.02 | 20.03 | | | |
| 35 | p | 8.26 | 8.40 | 8.33 | 8.81 | 8.81 | 8.81 | 8.57 | 1.24 | 0.43 | m |
| | q | 12.14 | 10.30 | 11.22 | 12.00 | 11.23 | 11.61 | 11.42 | | | |
| | p+q | 20.39 | 18.70 | 19.55 | 20.81 | 20.04 | 20.42 | 19.98 | | | |
| 36 | p | 8.75 | 8.10 | 8.42 | 8.70 | 9.71 | 9.21 | 8.82 | 1.16 | 0.47 | m |
| | q | 10.56 | 9.06 | 9.81 | 9.52 | 10.65 | 10.09 | 9.95 | | | |
| | p+q | 19.30 | 17.15 | 18.23 | 18.23 | 20.37 | 19.30 | 18.76 | | | |
| X | p | | | - | 32.34 | 28.75 | 30.55 | 30.55 | 4.60 | 0.41 | m |
| | q | | | - | 42.41 | 45.41 | 43.91 | 43.91 | | | |
| | p+q | | | - | 74.75 | 74.16 | 74.45 | 74.45 | | | |
| Y | p | 8.26 | 8.48 | 8.37 | | | - | 8.37 | 1.11 | 0.47 | m |
| | q | 9.66 | 9.40 | 9.53 | | - | - | 9.53 | | | |
| | p+q | 17.92 | 17.87 | 17.90 | | | - | 17.90 | | | |

1618.06

- Leyenda:
m = metacéntrico; sm = submetacéntrico; st = subtelocéntrico.



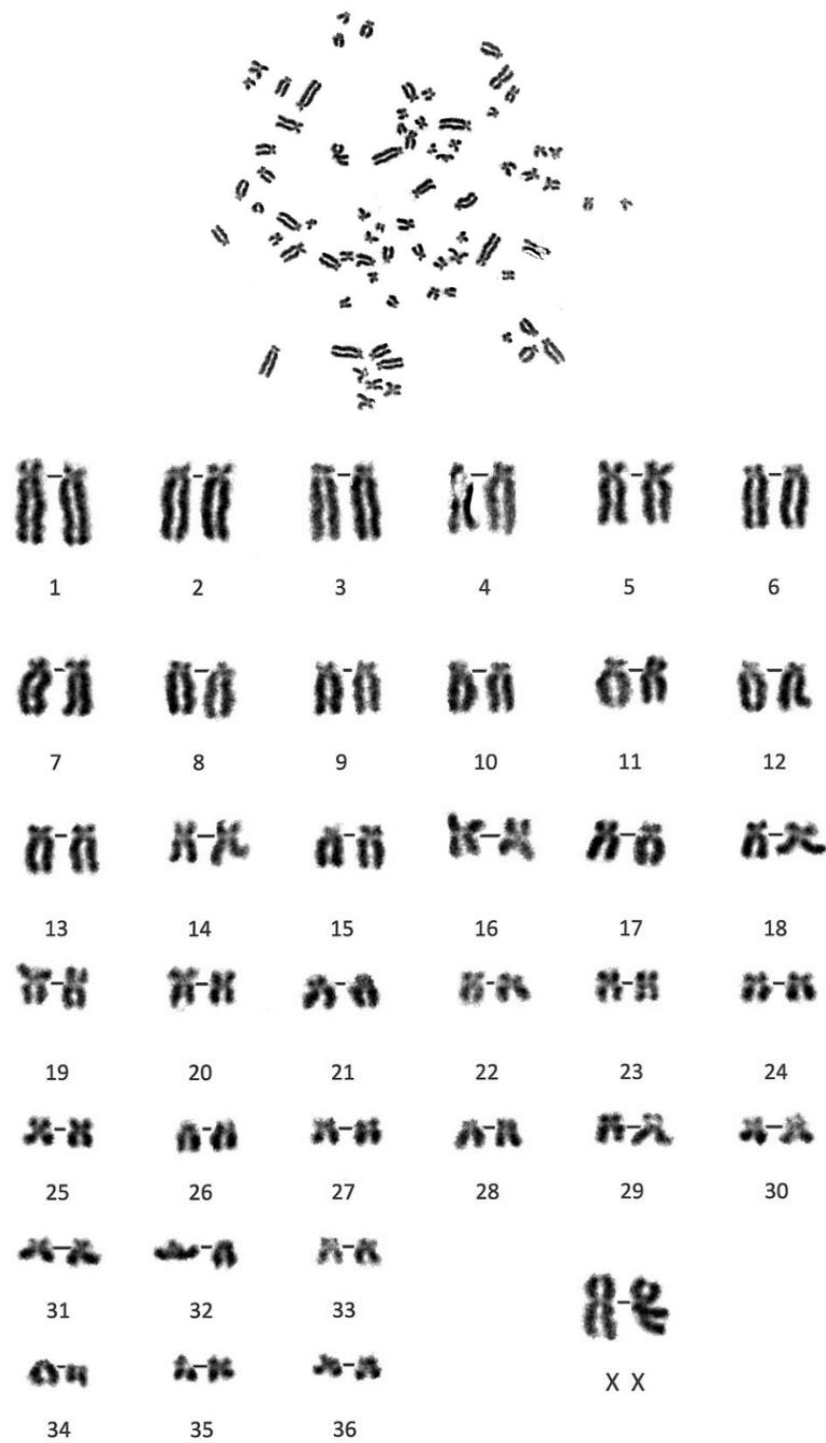
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 18: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



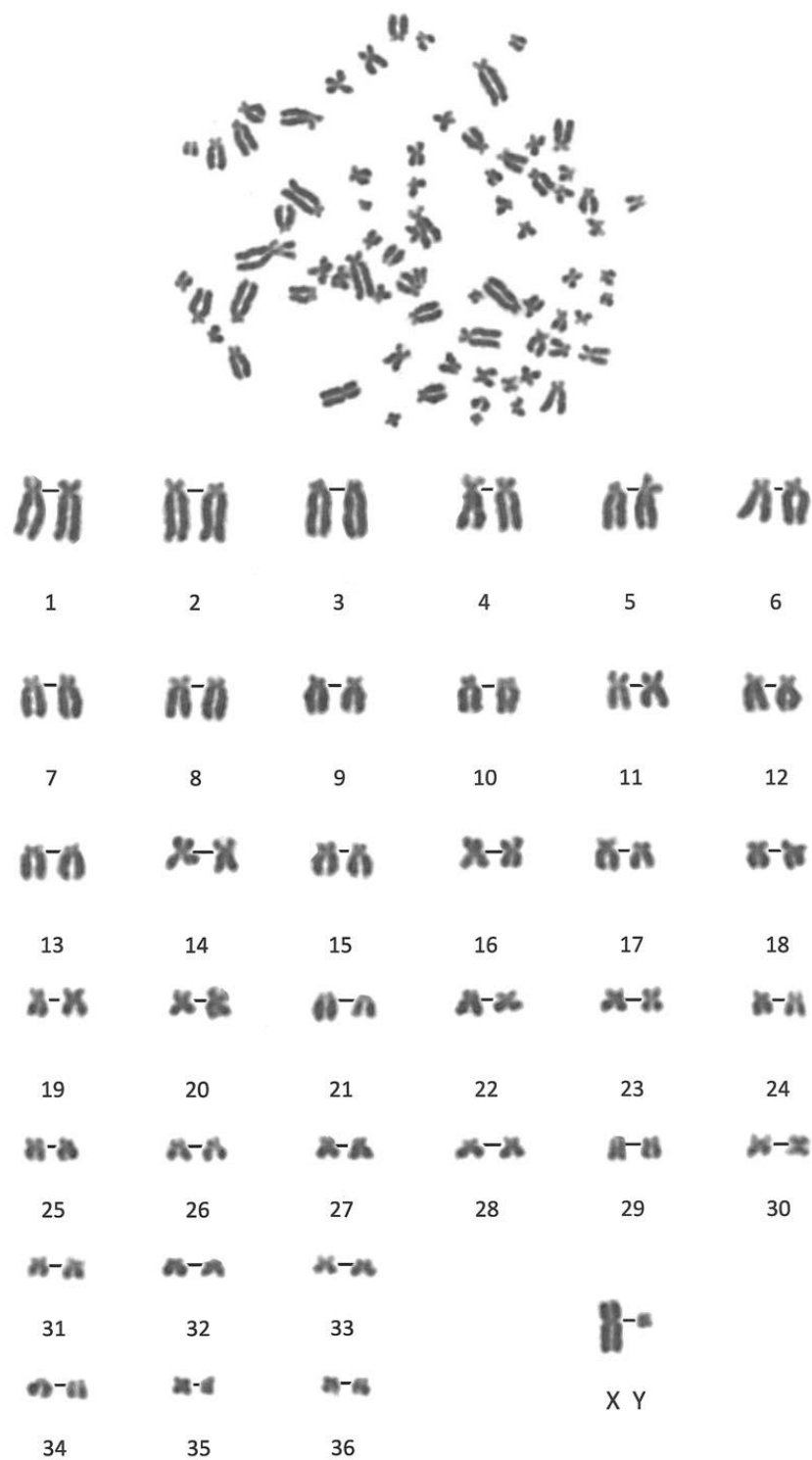
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 19: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



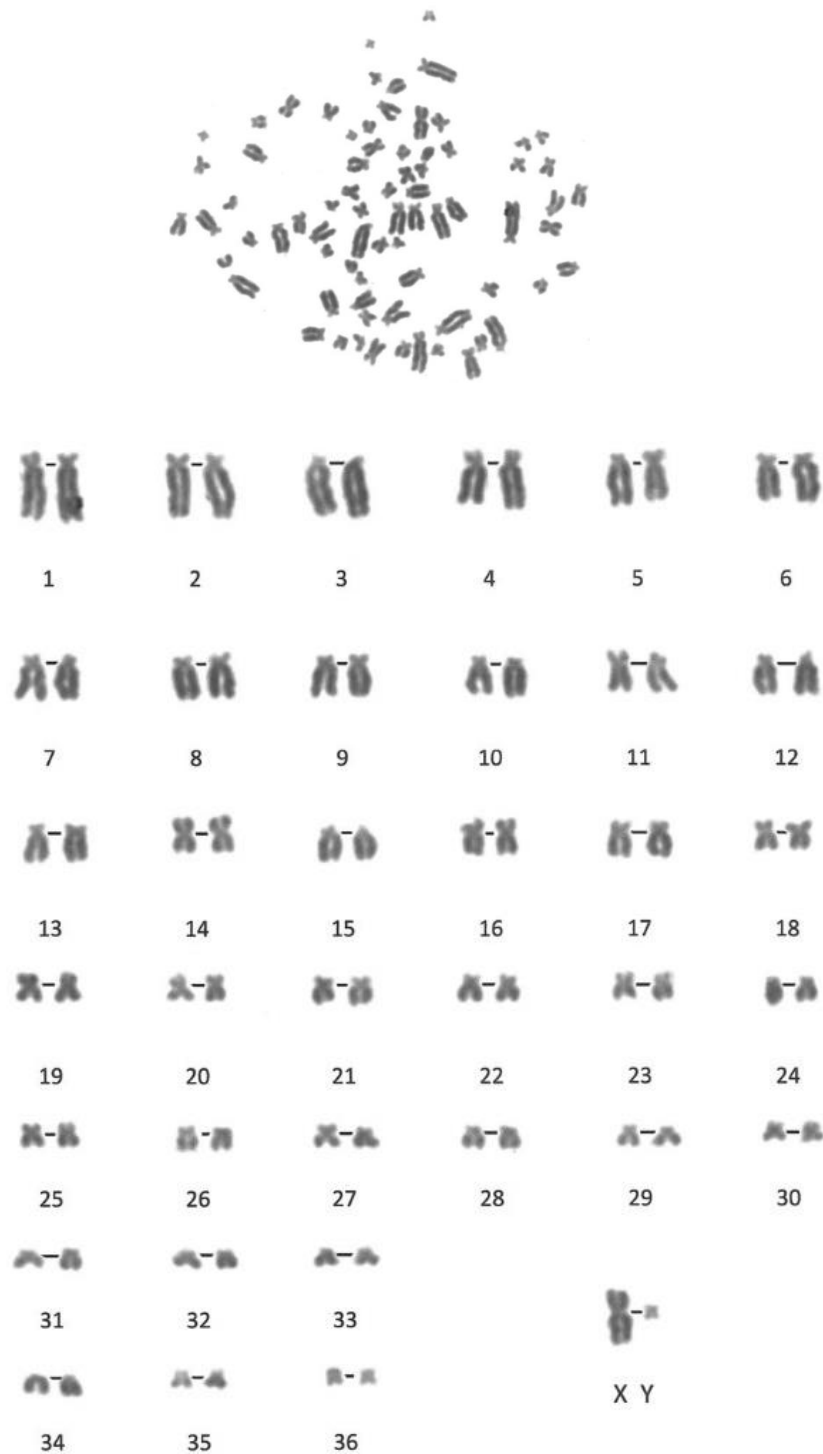
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 20: Metafase de la llama ♀ 8-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



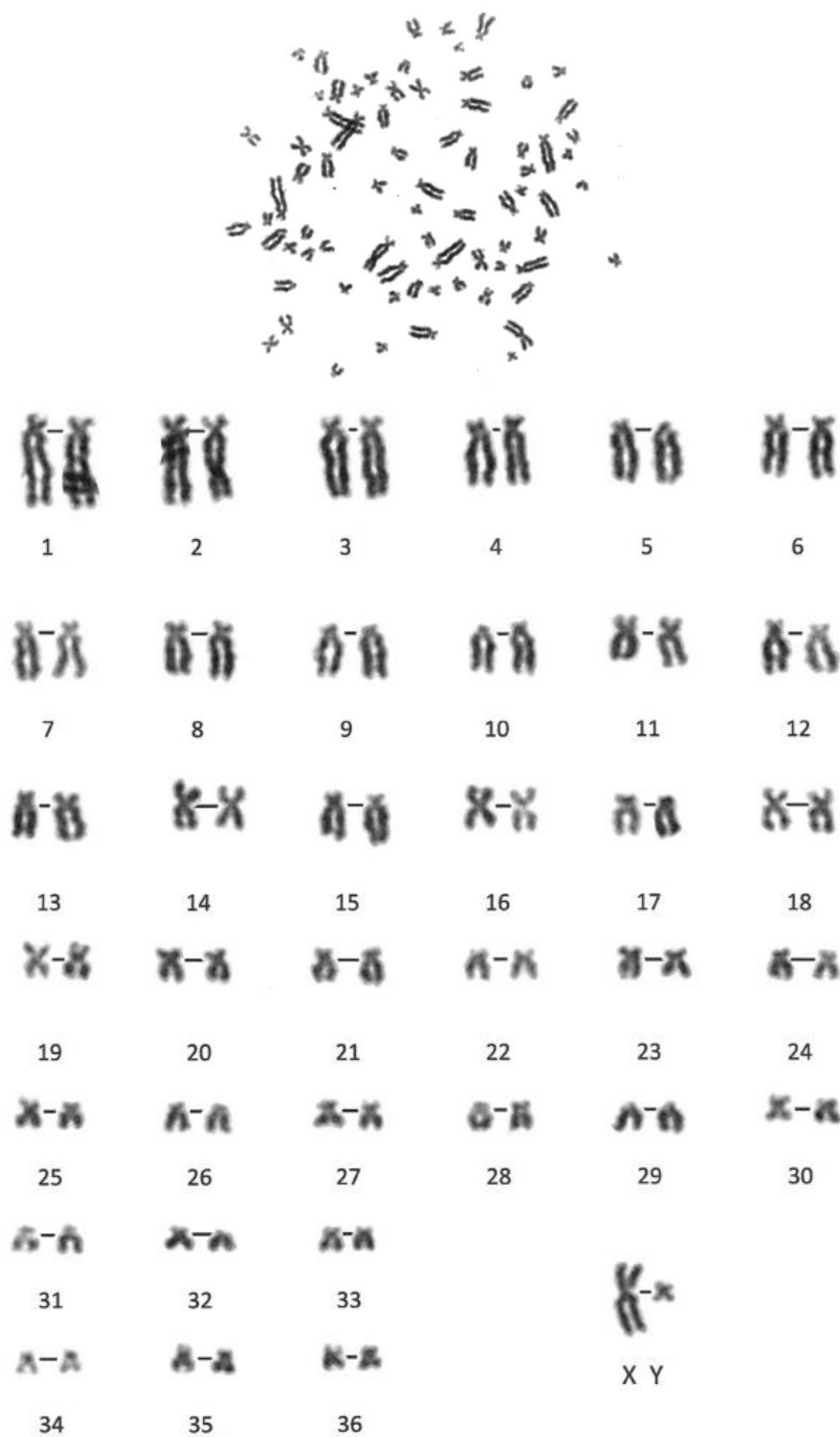
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 21: Metafase de la llama ♂ 10-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



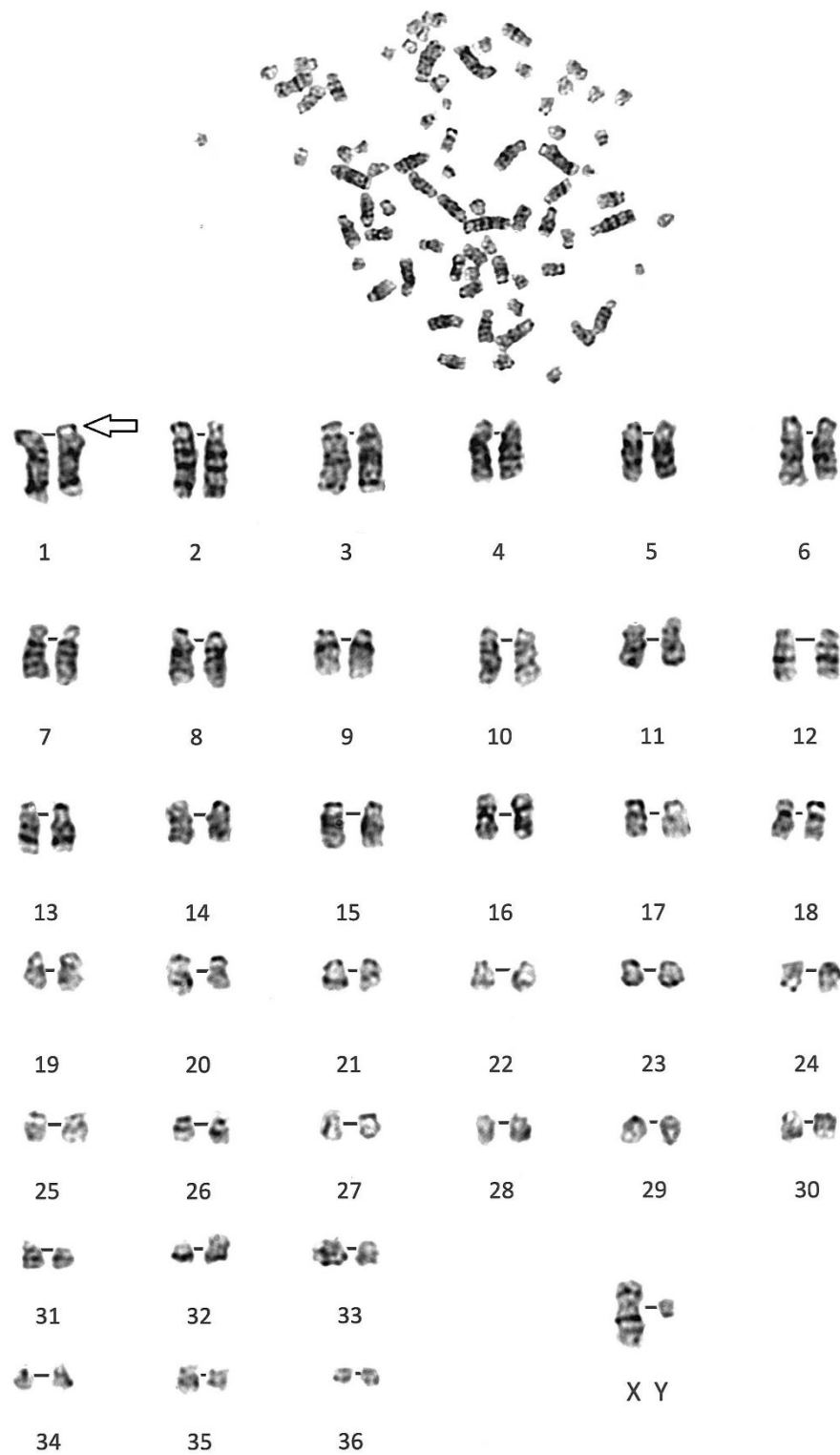
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 22: Metafase de la llama ♂ 10-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



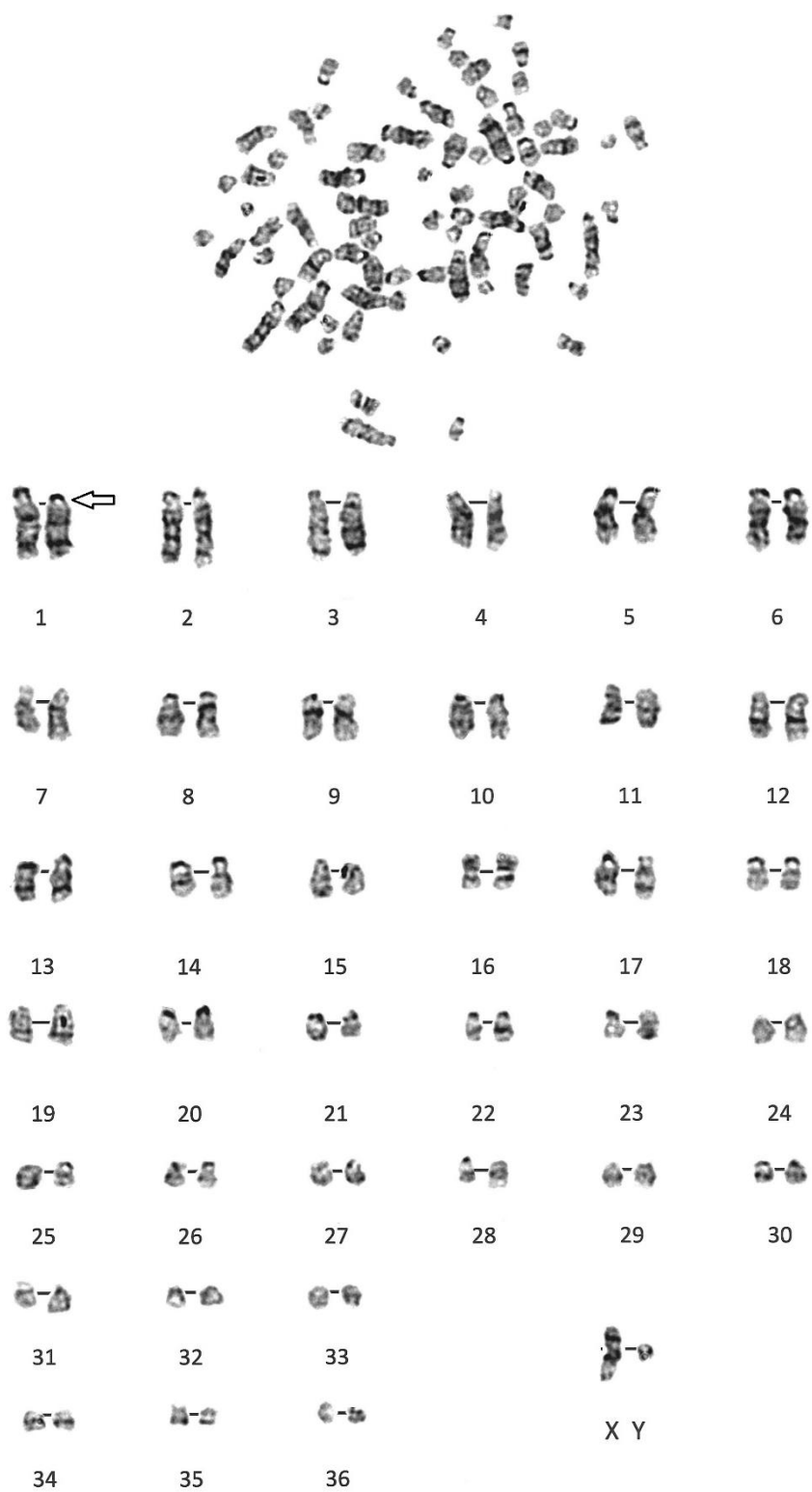
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 23: Metafase de la llama ♂ 11-A coloreada con Giemsa y su cariograma final.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 24: Metafase de la llama ♂ 1-A y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 1p.



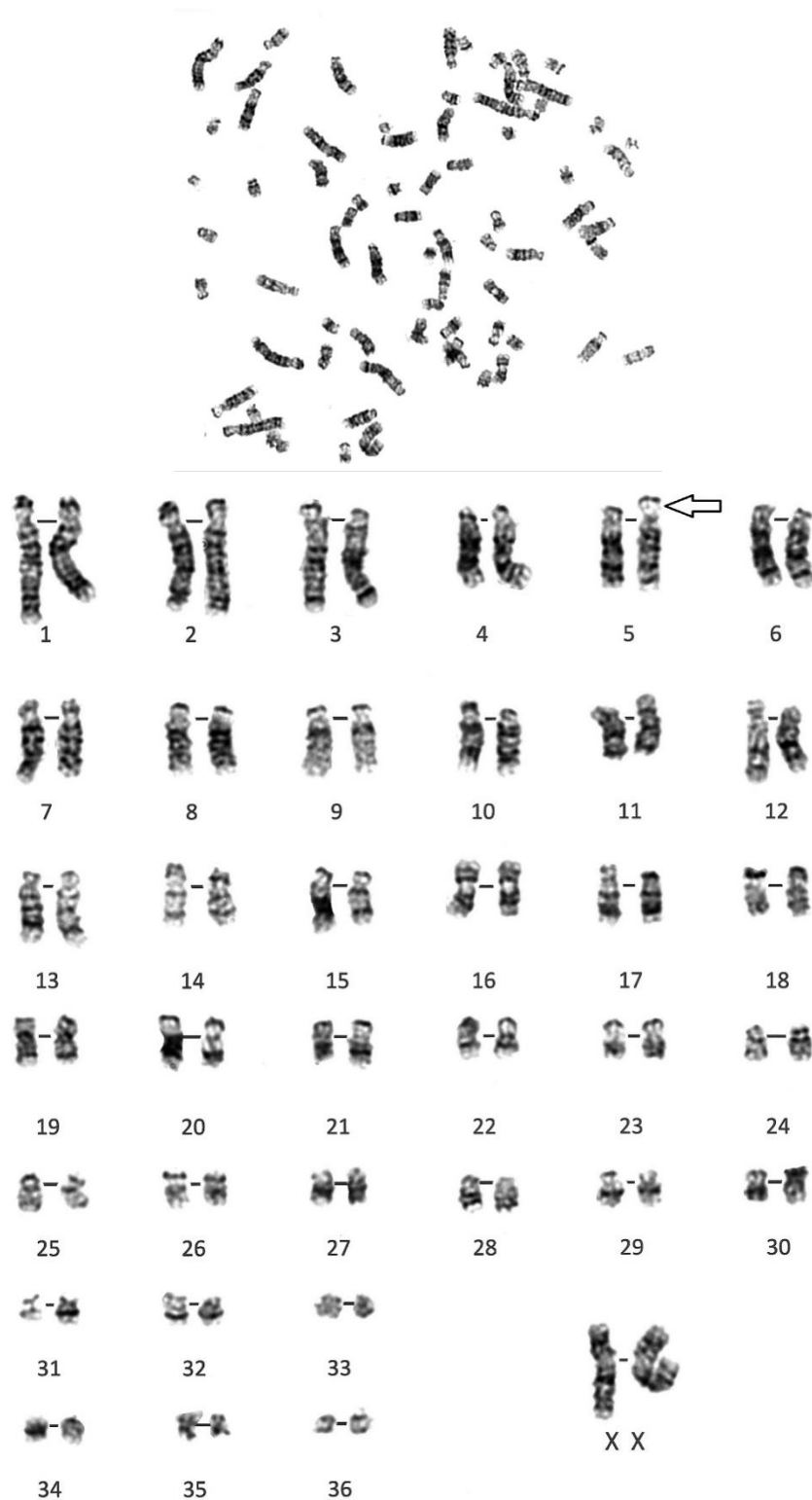
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 25: Metafase de la llama ♂ 1-A y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 1p.



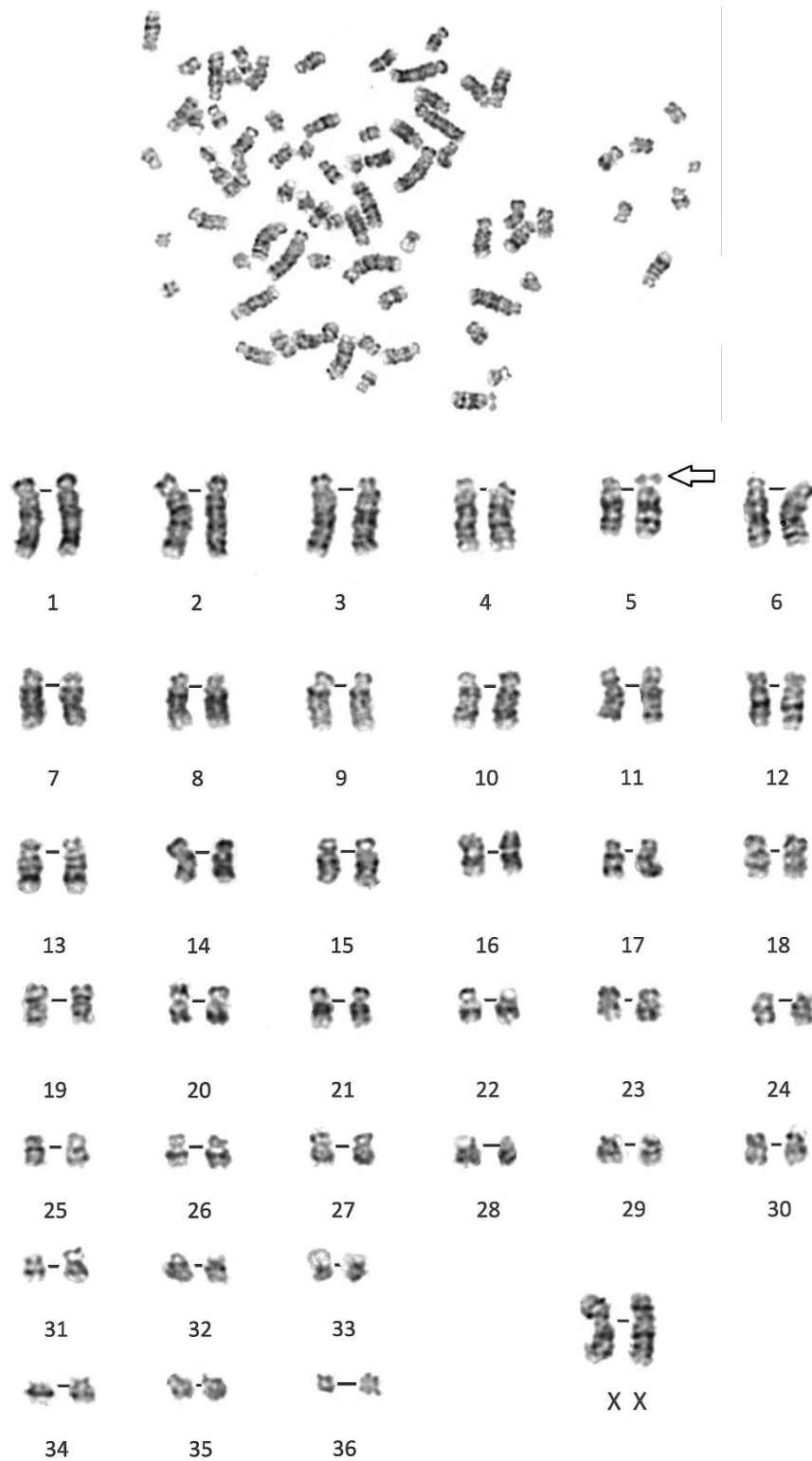
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 26: Metafase de la llama ♀ 1-H y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 1p.



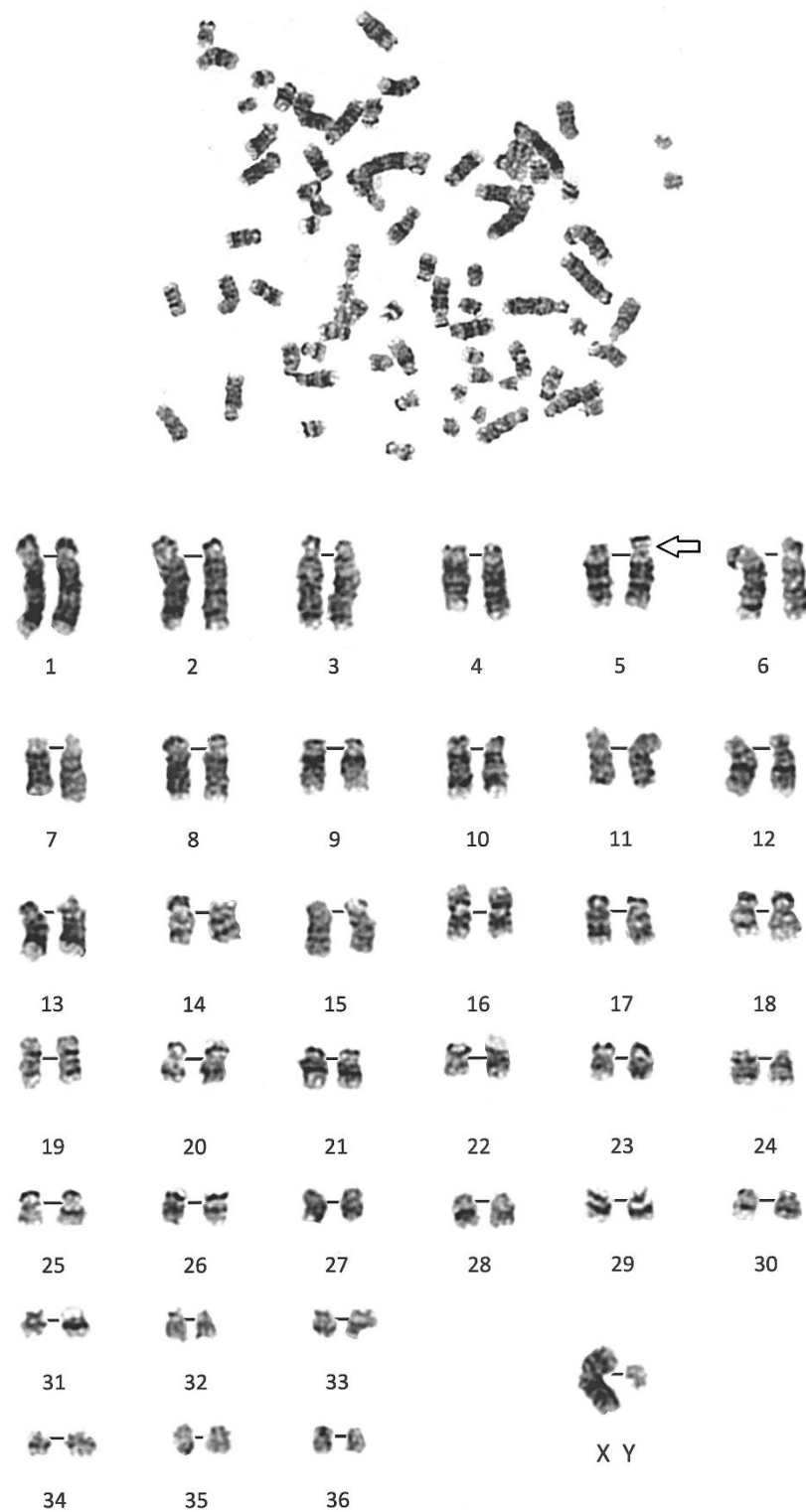
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 27: Metafase de la llama ♀ 3-A y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 5p. Su cariograma haploide se muestra en la figura junto con el idiograma de 431 bandas.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 28: Metafase de la llama ♀ 3-A y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 5p.



LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNMSM

Figura 29: Metafase de la llama ♂ 2-A y su cariograma de bandas G. La flecha señala la variante cromosómica 5p.

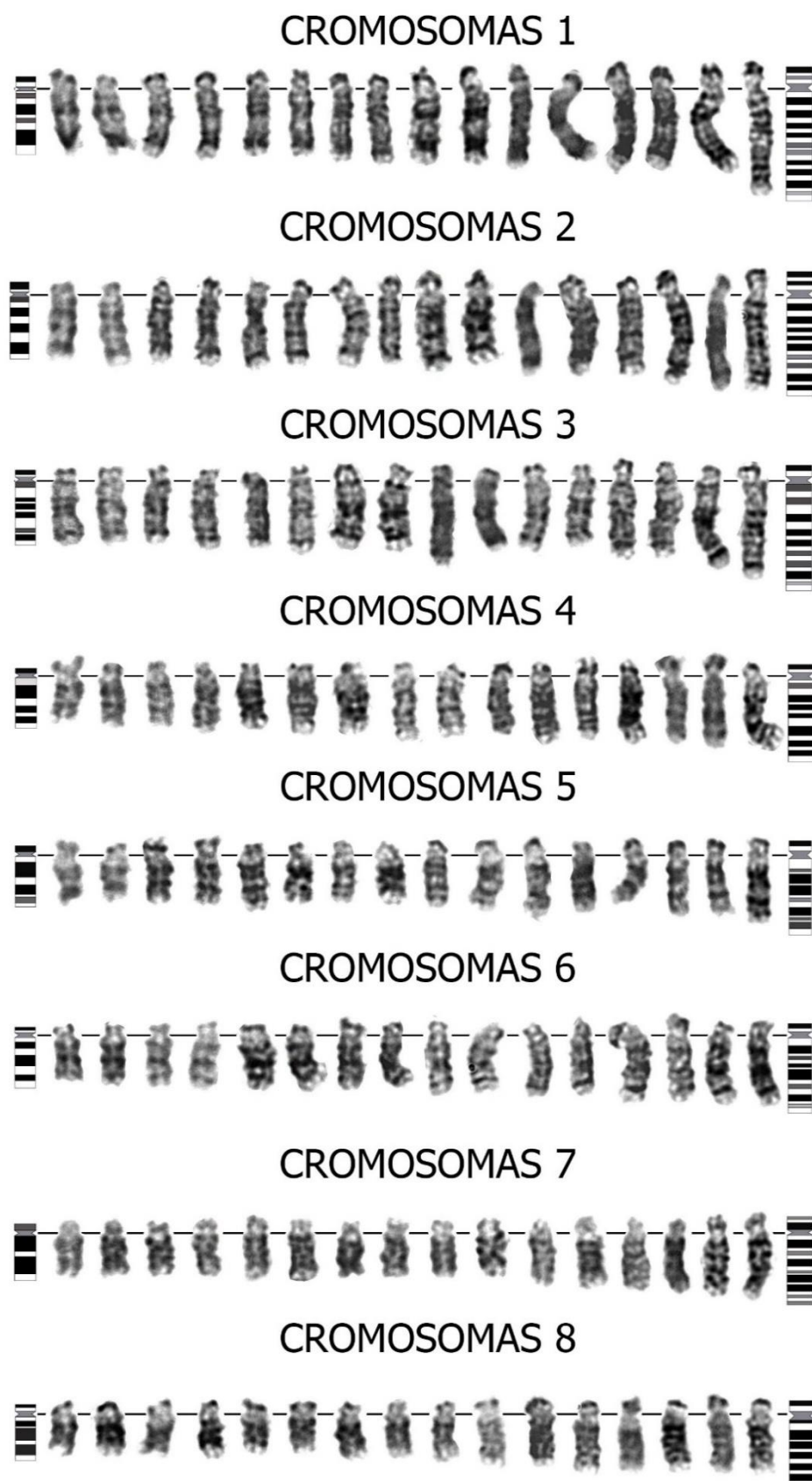
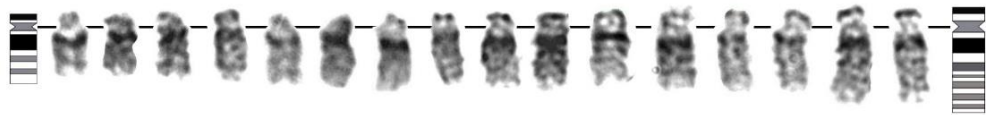
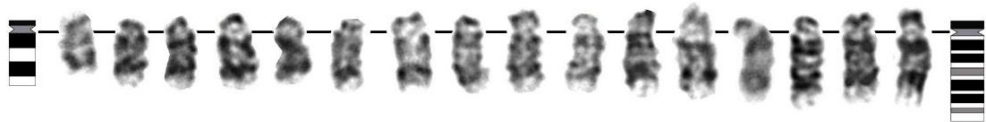


Figura 30: Cromosomas autosómicos y sexuales de llama de diferentes metafases con los idiogramas a las resoluciones de bandas de 231 (izquierda) y 421 (derecha).

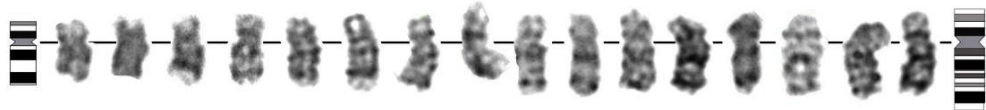
CROMOSOMAS 9



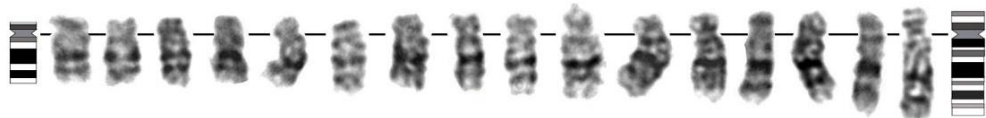
CROMOSOMAS 10



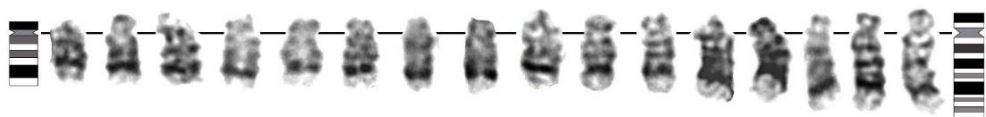
CROMOSOMAS 11



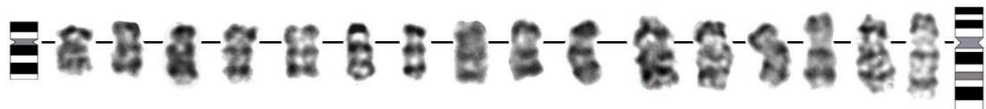
CROMOSOMAS 12



CROMOSOMAS 13



CROMOSOMAS 14



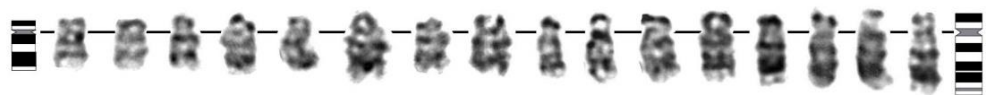
CROMOSOMAS 15



CROMOSOMAS 16



CROMOSOMAS 17



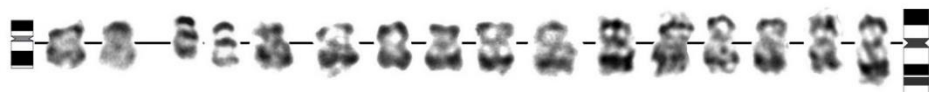
CROMOSOMAS 18



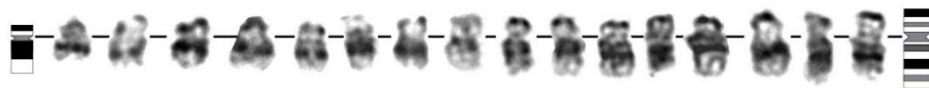
CROMOSOMAS 19



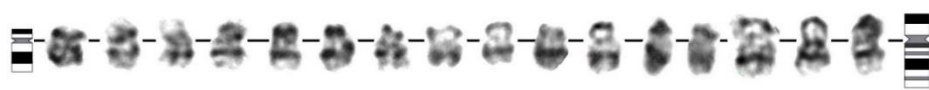
CROMOSOMAS 20



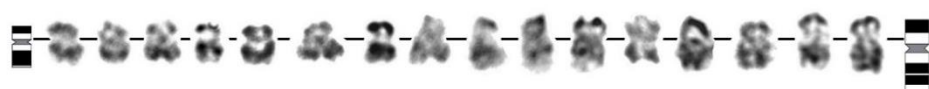
CROMOSOMAS 21



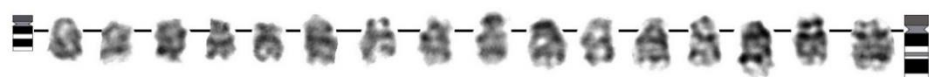
CROMOSOMAS 22



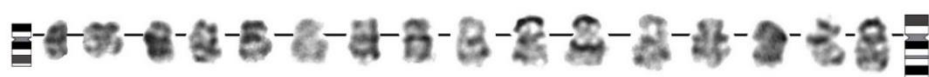
CROMOSOMAS 23



CROMOSOMAS 24



CROMOSOMAS 25



CROMOSOMAS 26



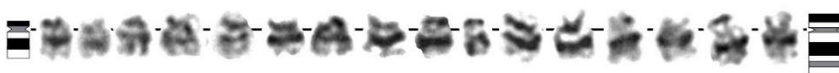
CROMOSOMAS 27



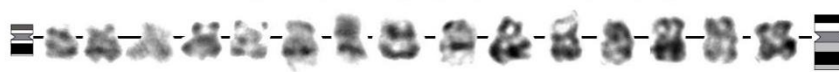
CROMOSOMAS 28



CROMOSOMAS 29



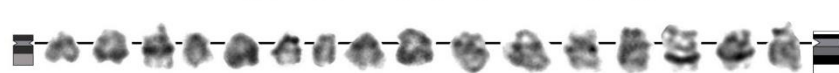
CROMOSOMAS 30



CROMOSOMAS 31



CROMOSOMAS 32



CROMOSOMAS 33



CROMOSOMAS 34



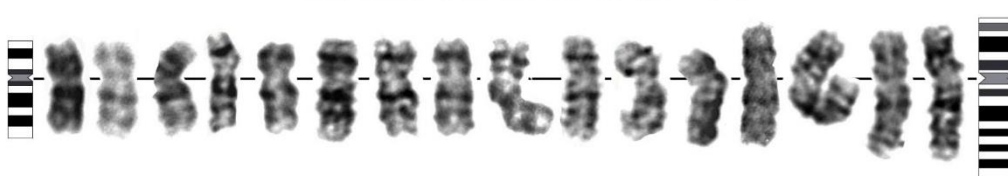
CROMOSOMAS 35



CROMOSOMAS 36



CROMOSOMAS X



CROMOSOMAS Y

